



SAPIENZA
UNIVERSITÀ DI ROMA

DOTTORATO DI RICERCA IN FARMACOLOGIA

(XXV ciclo)

- Facoltà di Farmacia e Medicina -

**Effetti di nocicettina/orfanina FQ e di UFP-101,
antagonista selettivo del recettore NOP, in un
modello di colite sperimentale nel ratto**

Tesi di dottorato di:

Dott.^{ssa} Chiara Giuli

***Coordinatore:* Prof. Lucia Negri**

***Docente guida:* Prof. Giovanna Improta**

Anno accademico 2011-2012

Sommario

INTRODUZIONE	3
IL SISTEMA NOCICETTINA/ORFANINA FQ (N/OFQ) – RECETTORE NOP	3
<i>N/OFQ</i>	3
<i>Recettore NOP</i>	14
<i>Spettro di attività biologiche</i>	21
<i>N/OFQ e sistema gastrointestinale</i>	30
<i>N/OFQ e sistema immunitario</i>	32
MALATTIE INFIAMMATORIE INTESTINALI	34
<i>Strategie terapeutiche nelle IBD</i>	40
<i>Modelli di infiammazione intestinale</i>	44
PREMESSE E SCOPO DEL LAVORO	47
MATERIALI E METODI.....	49
ANIMALI E INDUZIONE DELLA COLITE	49
PROTOCOLLO SPERIMENTALE	49
VALUTAZIONE DEL DANNO MACROSCOPICO.....	51
VALUTAZIONE DEL DANNO MICROSCOPICO	51
SAGGIO DELL'ATTIVITÀ MIELOPEROSSIDASICA (MPO).....	52
VALUTAZIONE DEI LIVELLI DI CITOCINE NELLA MUCOSA COLONICA.....	54
LIVELLI PLASMATICI DI N/OFQ.....	54
ANALISI STATISTICA	55
RISULTATI.....	57
PESO E CONSUMO DI CIBO.....	57
DANNO MACROSCOPICO.....	57
DANNO MICROSCOPICO	57
ATTIVITÀ MIELOPEROSSIDASI (MPO)	58
LIVELLI DI IL-1 β E IL-10 NELLA MUCOSA COLONICA	59
LIVELLI PLASMATICI DI N/OFQ.....	59
DISCUSSIONE.....	66
BIBLIOGRAFIA	74

INTRODUZIONE

Il sistema nocicettina/orfanina FQ (N/OFQ) – recettore NOP *N/OFQ*

Nel 1994, nel tentativo di clonare un nuovo recettore oppioide, alcuni ricercatori isolarono un cDNA codificante per un recettore allora sconosciuto (Mollereau et al., 1994). Tale recettore, che non mostrava affinità per i ligandi oppioidi endogeni noti, fu chiamato dapprima ORL1 (opiod receptor like 1), a causa dell'omologia nella sequenza primaria con i recettori oppioidi clonati precedentemente, e poi NOP (nociceptin/orphanin FQ peptide) (Cox et al., 2000). Il ligando endogeno per questo recettore fu identificato un anno più tardi, (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995) nel 1995, quando due gruppi di ricercatori in maniera indipendente riuscirono ad isolare, nel cervello di ratto e nell'ipotalamo di maiale, un peptide di 17 aminoacidi, considerato un nuovo membro della famiglia delle endorfine (Julius, 1995). A questo nuovo peptide fu dato il nome di nocicettina/orfanina FQ: “nocicettina”, sulla base di un'azione nocicettiva a seguito di somministrazioni intracerebroventricolari nel topo, “orfanina” per il fatto di essere il ligando naturale del recettore NOP, considerato fino a quel momento “orfano” del proprio agonista endogeno, e FQ per la presenza di una fenilalanina (F) nella posizione N-terminale e di una glutamina (Q) nella posizione C-terminale.

L'eptadecapeptide nocicettina/orfanina FQ (N/OFQ) ha un peso molecolare di circa 1810 (Meunier, 1997) e un'evidente omologia di struttura con i principali peptidi oppioidi endogeni dei mammiferi, in particolare con la dinorfina A, noto agonista dei recettori oppioidi di tipo kappa. Le sequenze aminoacidiche primarie di N/OFQ e dei

Peptide endogeno	Sequenza aminoacidica
<u>Nocicettina/orfanina FQ</u>	NH2- Phe-Gly-Gly-Phe -Thr-Gly-Ala-Arg-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys-Leu-Ala-Asn-Gln-COOH
Dinorfina A	NH2- Thr-Gly-Gly-Phe -Leu-Arg-Arg-Ile-Arg-Pro-Lys-Leu-Lys-Trp-Asp-Asn-Gln-COOH
β -endorfina	NH2- Thr-Gly-Gly-Phe -Met-Thr-Ser-Glu-Lys-Ser-Gln-Thr-Pro-Leu-Val-Thr-Leu-Phe-Lys-Asn-Ala-Ile-Ile-Lys-Asn-Ala-Thr-Lys-Lys-Gly-Glu-COOH
Leu-encefalina	NH2- Thr-Gly-Gly-Phe -Leu-COOH

Figura 1: Sequenza aminoacidica della nocicettina/orfanina FQ confrontata con quella di alcuni peptidi oppioidi.

peptidi oppioidi endogeni [Figura 1] presentano una serie di sequenze comuni: a) il tetrapeptide N-terminale Phe-Gly-Gly-Phe di N/OFQ, simile alla sequenza Thr-Gly-Gly-Phe presente in tutti i peptidi oppioidi; b) la porzione C-terminale di N/OFQ che presenta due coppie di aminoacidi basici analoghe ad alcune diverse combinazioni di aminoacidi carichi positivamente della dinorfina A e della β -endorfina; c) infine, la regione C-terminale di N/OFQ, la cui successione ripetuta (Ala-Arg-Lys-X / Ala-Arg-Lys-X-Ala) ricorda una sequenza presente sempre nella porzione C-terminale della β -endorfina di molti mammiferi (Lys-Asn-Ala-X-X-Lys-Asn-Ala) (Guerrini et al., 2000).

Un significativo numero di studi sul rapporto struttura-attività di N/OFQ (Reinscheid et al., 1996; Dooley & Houghten, 1996; Judd et al., 2004; Shimohigashi et al., 1996) ha messo in luce:

1. *la sequenza minima richiesta per una completa attività biologica in vitro e in vivo.* Le proprietà di peptidi tronchi della porzione C-terminale e di peptidi

mutati hanno permesso di stabilire che N/OFQ (1-13)-NH₂ è il più piccolo frammento di N/OFQ che mantiene le stesse attività biologiche del peptide naturale, cioè la stessa affinità, potenza biologica e selettività verso il recettore NOP. Inaspettatamente, anche la N/OFQ (6-17) e (12-17) mostrano un'elevata affinità per il recettore NOP (Butour *et al.*, 1997), mentre l'affinità cala drasticamente con i frammenti N/OFQ (1-11) e (1-7) (Dooley *et al.*, 1996).

2. *L'importanza di alcuni aminoacidi per il legame con il recettore e la sua attivazione.* Il tetrapeptide N-terminale di N/OFQ, (Phe-Gly-Gly-Phe), chiamato “message domain”, sembra essere necessario per l'attivazione del recettore (Calò *et al.*, 1997), mentre il gruppo di aminoacidi carichi positivamente presenti nella porzione C-terminale, (Arg⁸-Lys-Ser-Ala-Arg-Lys), denominati “address domain” sembra essere importante per l'occupazione del recettore (Guerrini *et al.*, 1997). Analisi più dettagliate del tetrapeptide hanno inoltre rivelato che, mentre il primo aminoacido Phe¹ può essere sostituito da gruppi chimici differenti senza causare una perdita di attività del peptide, il residuo Phe⁴ è assolutamente necessario affinché N/OFQ possa mantenere inalterata la sua attività biologica (Varani *et al.*, 1999). È stato infine dimostrato che non si possono modificare i residui Gly²-Gly³, evidenziando, perciò, l'importanza della distanza tra il primo e il quarto residuo aminoacidico per il mantenimento di una piena attività biologica del peptide (Chen *et al.*, 2004).

Sintesi, distribuzione e metabolismo di N/OFQ

N/OFQ, come tutti i neuropeptidi, deriva da un più grande precursore peptidico chiamato prepro-orfanina FQ/nocicettina (ppOFQ/N) che è stato clonato nel topo, nel ratto e nell'uomo (Nothacker et al., 1996; Reinscheid et al., 2000), e la cui porzione C-terminale, che include N/OFQ, ha una sequenza genica altamente conservata. Nell'uomo il precursore ppOFQ/N è costituito da ben 176 aminoacidi; il gene è stato localizzato nel cromosoma 8 (8p21) e mostra un'omologia di sequenza maggiore dell'80% con i geni di topo e di ratto (Mollereau et al., 1996). La struttura primaria del precursore contiene elementi strutturali caratteristici di un precursore neuropeptidico, in particolare un peptide segnale N-terminale necessario per la sua secrezione. Nella sequenza sono, inoltre, presenti coppie di residui di aminoacidi basici come Lys-Arg che funzionano da segnale per l'intervento di endopeptidasi specifiche capaci di idrolizzare il propeptide in tratti specifici della sua sequenza aminoacidica, portando alla formazione di numerosi neuropeptidi finali dotati di attività biologica [Figura 2]. Quando però è stata testata la loro capacità di legare il recettore NOP, non è stata osservata l'attivazione di alcun secondo messaggero intracellulare, e si è così compreso che tali peptidi, pur avendo un proprio ruolo fisiologico, attivano recettori diversi da quello di N/OFQ (Neal Jr et al., 2003). Il più studiato tra questi, è un peptide di 35 aminoacidi denominato nocistatina e generato dalla porzione N-terminale del precursore proteico, il cui nome riflette un'attività anti-nocicettina in quanto capace di bloccare l'allodinia e l'iperalgia indotte da N/OFQ (Okuda-Ashitaka et al., 1998; Okuda-Ashitaka & Ito, 2000; Chen et al., 2008). La nocistatina riduce il rilascio di glicina e di acido gamma-aminobutirrico (GABA) dalle corna dorsali del midollo spinale, ma non ha nessun effetto sul rilascio di L-glutammato

(Ahmadi et al., 2001). Questa forma di inibizione rimane inalterata in topi knockout per il recettore NOP; allo stesso modo l'impiego di [NPhe1ψ(CH₂-NH₂)Gly²]N(1-13)NH₂, un antagonista specifico per il recettore NOP, non sopprime l'effetto inibitorio sulla trasmissione sinaptica indicando che, probabilmente, l'azione della nocistatina non richiede l'attivazione del recettore NOP. E' interessante notare che la sequenza aminoacidica della nocistatina possiede la più alta variabilità inter-specie tra tutti i peptidi derivanti dalla ppOFQ/N.

Sulla base della presenza nella sequenza della ppOFQ/N di coppie di aminoacidi basici è stato identificato un altro peptide, l'eptadecapeptide, chiamato orfanina FQ2 (O/FQ2), che, come N/OFQ, è caratterizzato, dalla presenza di una fenilalanina (F) e da una glutamina (Q) rispettivamente in posizione N-terminale e C-terminale (Mogil & Pasternak, 2001; Amodeo et al., 2002; Neal Jr et al., 2003). La FQ2 manca di affinità per il recettore NOP e quando somministrata centralmente mostra un effetto analgesico dose-dipendente nei test dell'hot-plate e del tail-flick nel topo, che rende ipotizzabile la possibilità di un suo rilevante ruolo fisiologico nell'elaborazione degli stimoli dolorosi (Amodeo et al., 2000; Mathis et al., 2001).



Figura 2: Sequenza schematica del precursore della nocicettina prepro-orfanina FQ/nocicettina (ppN/OFQ). I colori evidenziano i diversi peptidi potenzialmente prodotti per splicing alternativo, durante il processo di maturazione del precursore.

Studi effettuati su neuroni e in linee cellulari di neuroblastoma hanno permesso di approfondire la conoscenza sulla regolazione genica di N/OFQ. L'aumento dei livelli di mRNA di N/OFQ nelle cellule di neuroblastoma NS20Y, così come la sintesi

del precursore, il suo processamento, e la secrezione stessa di N/OFQ sono eventi strettamente correlati ai livelli di cAMP (Sirianni et al., 1999). La clonazione della regione promoter, ossia la sequenza di DNA che segnala il punto di inizio della sintesi dell'mRNA, del gene di N/OFQ ha confermato la presenza di siti di legame per fattori di trascrizione regolati da cAMP e da meccanismi glucocorticoidi-mediati, ed ha anche messo in evidenza un possibile ruolo degli estrogeni nella stimolazione dell'espressione di N/OFQ e del suo recettore NOP (Flores et al., 2003).

Studi di immunoreattività hanno permesso di conoscere la distribuzione tissutale di N/OFQ e la localizzazione del suo precursore proteico e del suo recettore, dando un'indicazione sulle possibili funzioni e ruoli del sistema N/OFQ-recettore NOP (Letchworth et al., 2000).

Esiste una buona correlazione tra la distribuzione degli mRNA del precursore proteico ppN/OFQ e quella del peptide attivo, entrambi largamente espressi in aree del cervello coinvolte nella percezione sensoriale, nei processi di memoria e nel comportamento emotivo (Houtani et al., 2000), così come in diversi organi e tessuti periferici.

Sebbene gli studi sulla localizzazione di N/OFQ e del suo mRNA, siano stati eseguiti soprattutto sul sistema nervoso di roditori, in particolare nel sistema nervoso centrale di ratto (Neal et al., 1999a), recentemente è stata studiata la localizzazione del peptide nel cervello umano (Witta et al., 2004) che ha messo in luce la considerevole somiglianza nella distribuzione di N/OFQ nel sistema nervoso umano e in quello di roditori.

Nel prosencefalo il peptide è espresso soprattutto nel nucleo endopiriforme della corteccia, nel setto laterale, nel proencefalo ventrale, nell'ipotalamo, nei corpi mammillari, nei nuclei centrali e mediali dell'amigdala, nelle formazioni dell'ippocampo, nei nuclei parateniali e reticolari del talamo, nell'abenula mediale e nella zona incerta; mentre non è stato localizzato nella ghiandola pineale né nella ghiandola pituitaria.

Nel tronco encefalico N/OFQ è presente nell'area tegmentale ventrale, nella sostanza nera, nel nucleo della commissura posteriore, nella sostanza grigia centrale, nel nucleo di Darkschewitsch, nel nucleo peripeduncolare, nel nucleo interpeduncolare, nei nuclei tegmentali, nel locus coeruleus, nel rafe magno, nel nucleo parabranchiale laterale, nel complesso nucleare vestibolare, nel prepositus ipoglossale, nel nucleo solitario, nel nucleo ambiguo, nel nucleo spinale trigeminale caudale e nella formazione reticolare (Letchworth et al., 2000).

Nel midollo spinale, mRNA per N/OFQ è espresso in neuroni delle lamine I, II e X, nei neuroni delle corna dorsali e ventrali (Pettersson et al., 2002).

Una tale distribuzione dell'espressione del peptide a livello cellulare conferma il suo ruolo modulatorio in un gran numero di funzioni oltre la nocicezione, come per esempio, la regolazione del sistema nervoso autonomo in numerose attività fisiologiche e il controllo di funzioni motorie e dell'equilibrio.

Studi sulla localizzazione periferica di N/OFQ hanno messo in luce che mRNA del precursore proteico, ppN/FQ, sono presenti nella milza e nel rene fetale umano (Nothacker et al., 1996) e, a livelli paragonabili a quelli riscontrati nel cervello, nell'ovaio e nell'aorta di ratto (Mollereau et al., 1996; Wei et al., 1999), mentre livelli

moderati sono stati riscontrati nei testicoli. Nel sistema cardiovascolare, N/OFQ è espressa nell'arteria polmonare, nell'arteria e vena renale (Wei et al., 1999) che suggeriscono un ruolo regolatorio nelle funzioni cardiovascolari. La possibile implicazione funzionale della presenza di N/OFQ nel rene è stata confermata dagli effetti diuretici e antinatriuretici, messi in evidenza in seguito a somministrazione del peptide (Kapusta et al., 1999). Per quanto riguarda l'espressione di N/OFQ e del suo precursore proteico nell'apparato gastrointestinale esistono risultati contrastanti. Nell'intestino tenue di uomo e di ratto, si è rilevata rispettivamente scarsa quantità o totale assenza di mRNA di N/OFQ e del ppN/OFQ (Nothacker et al., 1996). Al contrario, indagini immunoistochimiche hanno evidenziato la presenza del peptide nello stomaco, nell'intestino tenue e nel colon di ratto (Yazdani et al., 1999; Mitsuma et al., 1998). La discrepanza tra l'espressione del messaggero e del peptide nell'intestino, in realtà, è attribuibile alla diversa sensibilità delle tecniche usate o alla instabilità dei messaggeri o del precursore peptidico. E' stata inoltre dimostrata la presenza del precursore proteico nell'intestino di maiale e di ratto (Reinscheid et al., 1996; Osinski et al., 1999a). Non è stata ancora dimostrata la presenza del peptide a livello delle strutture cutanee (Pettersson et al., 2002).

Per quanto riguarda il metabolismo della N/OFQ, sono state effettuate approfondite indagini in quanto la sua comprensione e conoscenza può avere interesse terapeutico (Roques et al., 1993).

I risultati, ottenuti in tessuti differenti sono spesso discordanti, e dipendenti dalle differenti condizioni sperimentali: *in vivo*, *in vitro* su fettine di cervello, su tessuto cerebrale dissociato da neuroni o con frazioni subcellulari. Inoltre è stato altrettanto

importante considerare il metabolismo plasmatico, quando il peptide è somministrato per via sistemica [**Tabella 1**].

<i>Species</i>	<i>Tissue</i>	<i>Condition</i>	<i>Main fragments</i>
<i>Rat</i>	<i>Brain</i>	<i>Microinjection into hippocampus</i>	<i>N1-13,N1-9</i>
<i>Mouse</i>	<i>Brain</i>	<i>Incubation with cortical slices</i>	<i>N1-7N1-11</i>
<i>Rat</i>	<i>Brain cells in culture</i>	<i>Incubation with cell extract</i>	<i>N1-13,N1-9</i>
<i>Rat</i>	<i>Spinal cord</i>	<i>Incubation with spinal cord tissue</i>	<i>N1-11,N1-6</i>
<i>Human</i>	<i>Tumor cells in culture</i>	<i>Incubation with cell extract</i>	<i>N1-13,N1-9</i>
<i>Human</i>	<i>Plasma</i>	<i>Incubation with plasma</i>	<i>N2-17,N3-17</i>

Tabella 1: Principali frammenti di nocicettina orfanina/FQ ottenuti in seguito al metabolismo del peptide in diversi tessuti (da Terenius et al., Peptides 2000; 919-922).

- i. Metabolismo del precursore di N/OFQ: Il precursore proteico ppN/OFQ viene metabolizzato nell'amigdala e nell'ipotalamo dall'enzima PC2, appartenente alla famiglia delle convertasi (Allen et al., 2001). In topi knockout per tale enzima, la sintesi di N/OFQ si riduce in maniera evidente (60-90%);
- ii. Metabolismo di N/OFQ in strutture cerebrali di ratto in vivo: Il metabolismo in vivo di N/OFQ è stato studiato nell'ippocampo di ratto (Sandin et al., 1999). I risultati mostrano che il peptide è diviso in due frammenti, N(1-13) e N(14-17), dal taglio enzimatico effettuato in siti preceduti da una coppia di residui basici Arg¹²-Lys¹³. Il primo frammento è poi scisso ulteriormente in N(1-9) e N(10-13) da un enzima che taglia in un sito preceduto da una seconda coppia di residui basici, Arg⁸-Lys⁹. Dal momento che i frammenti N(1-13) e N(1-9)

presentano la stessa sequenza C-terminale, Ala-Arg-Lys, è probabile che lo stesso enzima operi il taglio in due momenti consecutivi;

- iii. Metabolismo di N/OFQ in strutture cerebrali di topo in vitro: gli studi di metabolismo compiuti su fettine corticali di cervello di topo incubate con N/OFQ hanno messo in luce la presenza di due enzimi attivi: aminopeptidasi N e endopeptidasi 24.15, che formano quattro principali metaboliti di N/OFQ: N(2-17), N(1-12), N(1-11), N(1-7) (Montiel et al., 1997). La somministrazione centrale di inibitori di questi enzimi potenzia gli effetti caratteristici dati dalla somministrazione di N/OFQ sull'apparato locomotorio (Noble & Roques, 1997);
- iv. Metabolismo di N/OFQ nel midollo spinale di ratto: utilizzando la spettrometria di massa si è visto che nel midollo spinale di ratto la metabolizzazione di N/OFQ dà luogo ad un frammento N(1-11) successivamente ridotto a N(1-6) come prodotto finale. Il taglio è operato da una Ser-endopeptidasi dipendente da ioni metallici. Il frammento N(1-6) ha mostrato di possedere un effetto bifasico in diversi test di dolore: in seguito a somministrazione intracerebroventricolare (ICV) e intratecale (IT) provoca analgesia seguita poi da iperalgesia (Suder et al., 1999);
- v. Metabolismo di N/OFQ nelle colture cellulari: per cercare di ridurre la complessità del tessuto cerebrale e le numerose interazioni, studi di metabolismo sono stati condotti su colture di cellule corticali primarie di cervello di ratto, di neuroblastoma umano SH-SY5Y e di piccole cellule di carcinoma polmonare U1690. In tutti questi tipi cellulari è stata osservata la

formazione degli stessi frammenti: N(1-13) e N(1-9). Il taglio enzimatico è inibito da metalli e da sostanze reagenti con il gruppo –SH; ciò suggerisce che l'enzima sia una metallo-endorpeptidasi. Trattando le cellule per cinque giorni con morfina si è notato un incremento dei livelli dei principali frammenti e anche la comparsa di altri frammenti di lunghezza inferiore (N1-12; N1-6 e N1-5). Inoltre è stato verificato che il rilascio e la produzione di N/OFQ aumentano in ratti tolleranti verso la morfina indicando che la morfina è in grado di modulare sia il rilascio che la degradazione di N/OFQ (Yuan et al., 1999);

- vi. Metabolismo di N/OFQ nel plasma umano: nell'uomo N/OFQ è degradata da aminopeptidasi plasmatiche, nei confronti delle quali si è dimostrata essere più resistente rispetto alla dinorfina A (Yu et al., 1996). Il metabolita principale è N(2-17), che viene successivamente metabolizzato in N(3-17), N(4-17) e N(4-15).

Sebbene la maggior parte dei metaboliti derivanti dalla degradazione del peptide perdano affinità per il recettore NOP, alcuni mantengono in ogni modo un'attività biologica (Reinscheid et al., 1996; Dooley & Houghten, 1996). Un interessante esempio è dato dal frammento N(1-7). In alcuni studi N/OFQ somministrata per via intratecale nel topo induce iperalgesia e, sorprendentemente, tale effetto è bloccato da antagonisti dei recettori tachichinergici NK1, suggerendo che l'aumento di sensibilità al dolore sia un effetto mediato dal rilascio di sostanza P dalle afferenze primarie. Tale effetto viene inoltre bloccato proprio dal frammento N(1-7) (Sakurada T et al., 1999). Anche altri frammenti N-terminali somministrati per via intratecale

presentano ancora attività biologica e influenzano ad esempio alcuni comportamenti tipici dell'animale come lo scratching (grattare), il licking (leccare), il biting (mordicchiare) (Sakurada T et al., 2000). E' risultato interessante anche il frammento N(1-13), in quanto capace di modulare l'azione di N/OFQ a livello spinale. Altro interessante frammento è N(1-11) che mostra un'azione analgesica naloxone-dipendente (Rossi et al., 1997; Rossi et al., 1998).

Recettore NOP

Differenti gruppi di ricerca, impiegando tecniche di biologia molecolare, hanno messo in evidenza, nel breve volgere di un biennio (1994-1995), l'esistenza di sequenze geniche codificanti per una proteina di circa 370 aminoacidi, la cui struttura primaria mostrava le caratteristiche di un recettore a 7 domini transmembranari. Questo recettore, i cui geni sono stati identificati nel topo, nell'uomo e nel ratto (Mollereau et al., 1994; Chen et al., 1994), presenta marcate analogie di sequenza aminoacidica con i differenti tipi di recettori oppioidi ma non è in grado di interagire efficacemente con ligandi per tali recettori (Wick et al., 1994; Meunier et al., 2000).

L'allineamento delle sequenze aminoacidiche del recettore NOP con quella dei recettori oppioidi mu, delta e kappa, ha evidenziato un'omologia di sequenza: (i) maggiore del 75% nel 2°, 3° e 7° dominio transmembranario; (ii) maggiore del 50% nel 1°, 5° e 6° dominio transmembranario e nei quattro loop intracellulari; (iii) minore del 50% nel 4° dominio transmembranario e nella 2° e 3° ansa extracellulare (Meunier et al., 2000) [**Figura 3**].

Benché esistano differenze di sequenza tra le varie forme di recettore per la nocicettina isolato in differenti specie, permane un'omologia superiore al 90% (Meunier et al., 2000).

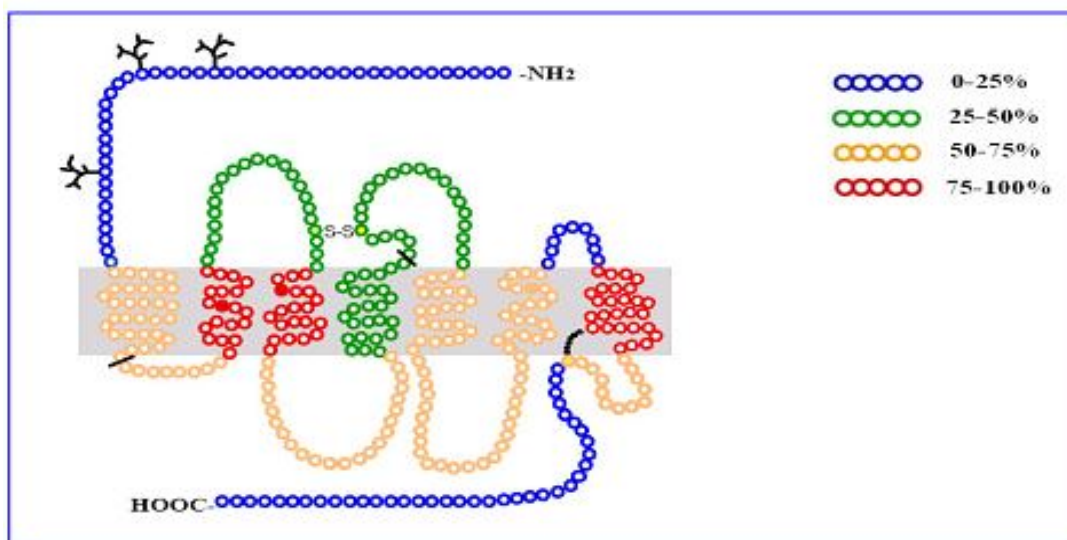


Figura 3: Rappresentazione grafica dell'omologia di sequenza del recettore NOP con quella dei recettori oppioidi mu (μ), delta (δ) e kappa (κ).

L'alta omologia strutturale del recettore NOP e dei recettori oppioidi ha fatto pensare che esistesse un'altrettanta equivalenza strutturale con i recettori oppioidi nel sito di legame con l'agonista e nelle vie di traduzione associate all'attivazione del recettore stesso. Come i recettori oppioidi, infatti, NOP appartiene alla superfamiglia dei recettori associati alle proteine G (GPCRs) ed è in grado di attivare le stesse vie di trasduzione (Moran et al., 2000). In seguito al legame con N/OFQ, il recettore NOP attiva proteine G inibitorie del tipo Gi/Go determinando: l'inibizione dell'adenilato ciclasi e quindi della produzione di cAMP (Meunier et al., 1995); l'aumento della conduttanza al potassio (Vaughan et al., 1996); l'inibizione dei canali del calcio voltaggio-dipendenti in particolare quelli di tipo N (Condor et al., 1996). A livello

cellulare tutti questi effetti contribuiscono ad inibire l'attività neuronale e il rilascio di neurotrasmettitore e quindi a conferire al recettore stesso una funzione neuromodulatoria.

Sulla base dei dati ottenuti sperimentalmente è stato costruito un modello tridimensionale che descrive il complesso di interazione N/OFQ-NOP (Topham et al., 1998) [**Figura 4**]. Nel recettore è stato caratterizzato un esteso sito di legame capace di accogliere il frammento N(1-13), noto per essere il più piccolo analogo di N/OFQ dotato di piena attività biologica. Si è ipotizzato che i due anelli aromatici del tetrapeptide N-terminale di N/OFQ (Phe-Gly-Gly-Phe) siano accolti in distinti siti all'interno di una tasca del recettore, altamente conservata, localizzata nel fondo di una cavità formata dalle eliche transmembranarie 3, 5, 6 e 7. Questa tasca, strutturalmente equivalente al sito di legame per i recettori oppioidi mu, delta e kappa, contiene un residuo di Asp 130 che si pensa possa interagire con la porzione N-terminale protonata di N/OFQ. Il modello inoltre mostra che, per l'attivazione del recettore è necessario il frammento N(8-13) di N/OFQ, ricca di residui cationici (Reinscheid et al., 1996), ed in grado di stabilire molteplici contatti con il secondo loop extracellulare acido del recettore. I dati ottenuti da diversi studi di binding suggeriscono che l'energia di legame fornita dal peptide N(1-4) non è di per sé sufficiente ad attivare il recettore, ma necessita del contributo dato dalle specifiche interazioni elettrostatiche con il secondo loop extracellulare (Dooley et al., 1997).

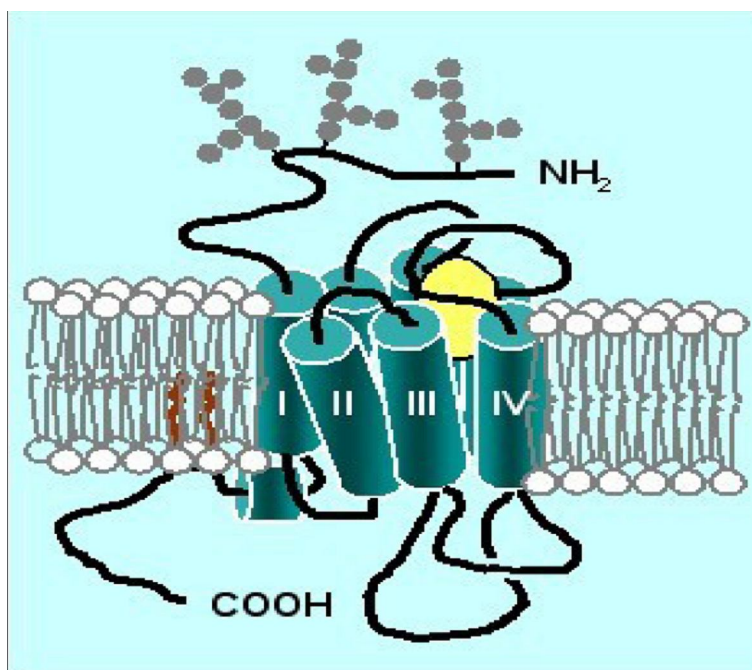


Figura 4: Rappresentazione schematica di un modello tridimensionale del complesso recettore NOP e N/OFQ (in bianco). Le eliche transmembrana sono numerate da I a VII.

Anche il gene per il recettore NOP è stato parzialmente caratterizzato e dal punto di vista dell'organizzazione esoni-introni, è molto simile ai geni delle tre classi recettoriali degli oppioidi; ciò indica che i quattro geni si sono evoluti a partire da un comune gene ancestrale e quindi dalla stessa famiglia. Inoltre sembra che, dal punto di vista evoluzionistico, il gene per NOP sia il più antico dei quattro dal momento che sequenze geniche simili a NOP, ma non degli altri tre recettori, sono state ritrovate nei teleostei (Darlison et al., 1997) e nei pesci cartilaginei (Li et al., 1996), ma non ancora negli invertebrati.

Attualmente non vi sono evidenze che indichino l'esistenza di sottotipi recettoriali distinti per N/OFQ (Mogil & Pasternak, 2001), anche se, sono state identificate delle varianti di splicing; come nel caso degli altri membri della famiglia dei recettori oppioidi, il gene per il recettore NOP è, infatti, sottoposto a splicing

alternativo. Varianti recettoriali sono state identificate nei linfociti di topo (Halford et al., 1995), nel cervello di topo (Pan et al., 1998), ratto (Xie et al., 2000) e di uomo (Peluso et al., 1998). Tutte le varianti del recettore NOP sono rappresentate da proteine tronche che non sono in grado di funzionare come recettori tradizionali accoppiati a proteine G, anche se questo non necessariamente implica che non abbiano un qualche significato funzionale (Currò et al., 2001). E' interessante notare che varianti simili di recettore tronco sono state riportate in tutti i geni che codificano per gli altri recettori oppioidi finora conosciuti.

Distribuzione del recettore NOP

Ancora prima di identificare il ligando endogeno del recettore, la distribuzione dei trascritti nei tessuti di topo è stata analizzata attraverso studi di ibridazione in situ (Fukuda et al., 1994; Lachowicz et al., 1995), analisi di Northern (Chen et al., 1994) e RT-PCR (Wang et al., 1994).

Studi condotti su topi knock out rispettivamente per recettori oppioidi mu, delta e kappa hanno mostrato una variazione del numero e della distribuzione del recettore NOP nel cervello murino. In particolare topi knock out per il recettore di tipo delta mostrano una sovraespressione del recettore NOP in tutte le regioni cerebrali in particolare nelle zone corticali; topi knock out per il recettore di tipo kappa mostrano un'espressione inferiore del recettore NOP mentre la perdita del recettore mu non mostra nessun tipo di alterazione dell'espressione di NOP. Questi dati dimostrano che esiste un'interazione tra il sistema orfaninergico e i recettori oppioidi e che questa correlazione risulta essere recettore-specifica (Slowe et al., 2001).

Studi di immunolocalizzazione del recettore nel ratto hanno permesso di individuarne la distribuzione nel cervello e a livello spinale di questa specie. La presenza del recettore in realtà non è limitata al SNC, ma è rilevante anche su sistemi ed organi periferici.

A differenza della distribuzione dei recettori oppioidi, nel cervello la presenza di NOP sembra essere uniforme in specie diverse. Un'analisi completa della distribuzione del recettore nel cervello di ratto ha evidenziato che il recettore è densamente espresso in molte aree corticali, nel nucleo olfattorio anteriore, nel setto laterale, nel prosencefalo ventrale, in molti nuclei ipotalamici e talamici, nelle formazioni dell'ippocampo, nell'amigdala basolaterale e mediale, nella sostanza grigia centrale, nel nucleo del ponte, nel complesso nucleare vestibolare, nel nucleo endopiriforme, in molti nuclei motori del tronco encefalico, in nuclei profondi cerebellari, nel nucleo del tratto solitario e nella formazione reticolare (Neal Jr et al., 1999b).

Nei roditori è stata evidenziata una buona correlazione tra la presenza degli mRNA di NOP e la presenza di N/OFQ, e ciò indica che i recettori sono localizzati in maniera predominante in circuiti neuronali locali dove potrebbero esercitare una funzione modulatoria (Letchworth et al., 2000).

A livello del midollo spinale di ratto mRNA di NOP sono stati ritrovati nella sostanza grigia, sia delle corna dorsali che di quelle ventrali (Pettersson et al., 2002). Sembra che la maggior parte dei recettori sia localizzata sugli interneuroni delle corna dorsali dove possono partecipare alla locale regolazione della trasmissione del dolore (Zeilhofer & Calò, 2003). Non si può escludere comunque che i recettori NOP siano

espressi anche sulle terminazioni delle vie discendenti centrali e/o sulle afferenze sensorie periferiche.

Il recettore NOP è stato, inoltre, chiaramente identificato nel sistema nervoso periferico e in diversi organi isolati. Alcuni studi indicano che il recettore è espresso nell'intestino e nei dotti deferenti di ratto (Wang et al. 1994), nel plesso mienterico (Yuce et al, 2007), così come nel tratto gastrointestinale e nel rene di maiale e in diversi gangli di cavia quali il ganglio prevertebrale simpatico (mesenterico superiore celiaco, mesenterico inferiore), il ganglio paravertebrale simpatico (cervicale superiore, stellato, catena lombare) e gangli giugulari (Kummel & Fische, 1999). Infine siti ad alta affinità di legame per N/OFQ sono stati ritrovati nella retina e nel cuore di ratto (Makmam & Dvorkin, 1997; Malinowska et al., 2002).

Oltre al sistema nervoso, anche il sistema immunitario rappresenta un altro sito di localizzazione del recettore NOP. Gli mRNA si esprimono nei linfociti splenici di topo (CD4+,CD8+,CD4-,CD8-) e in molte cellule immunitarie umane (linfociti B e cellule T, monociti, così come linfociti e monociti circolanti) (Halford et al., 1995; Peluso et al., 1998).

In sintesi possiamo affermare che il recettore NOP è largamente espresso nel cervello, nel midollo spinale, e nel sistema nervoso periferico, in aree coinvolte in processi quali la percezione del dolore, la memoria, lo stress, la locomozione, la regolazione ormonale, il sistema immunitario. Una così ampia distribuzione riflette il coinvolgimento del sistema N/OFQ-recettore NOP in un gran numero di risposte fisiologiche e nell'ambito del controllo omeostatico di altri circuiti neuronali.

Spettro di attività biologiche

L'impiego di N/OFQ esogena, la disponibilità di antagonisti (Guerrini et al., 1998; Calò et al., 2002; Trapella et al., 2006; Rizzi et al., 2007a; Spagnolo et al., 2007), e di agonisti (Reinscheid et al., 1998; Kuo et al., 2008; Fischetti et al. 2009) altamente selettivi per il recettore NOP, ha permesso di caratterizzare l'ampio spettro di attività biologiche mediate da questo nuovo sistema, spesso simile a quello degli oppioidi, ma in molti casi capace di evocare effetti farmacologici differenti e addirittura opposti (Heinricher, 2003).

Nella **Figura 5** sono riportati schematicamente i principali effetti mediati dal sistema N/OFQ-recettore NOP.

Nocicezione

Il sistema N/OFQ-recettore NOP riveste nell'ambito della nocicezione un ruolo sempre più importante, ed un numero sempre crescente di studi mostra che N/OFQ interferisce con i processi di nocicezione a tre differenti livelli di integrazione: a livello di centri cerebrali superiori, del midollo spinale ed a livello periferico nelle fibre afferenti primarie (Zeilhofer & Calò, 2003; Lambert GD, 2008). A conferma del coinvolgimento del sistema N/OFQergico nella modulazione del dolore vi è la diffusa distribuzione sia di N/OFQ che del recettore NOP in aree associate alla nocicezione, in particolare nelle corna dorsali del midollo spinale, nel nucleo del rafe magno e nell'area grigia periacqueduttale (Neal et al., 1999; Neal Jr et al., 1999).

Il sistema N/OFQ-recettore NOP media effetti differenti a seconda dei modelli di dolore e della via di somministrazione, ma in generale, i dati in nostro possesso permettono di distinguere effetti sopraspinali, spinali e periferici.

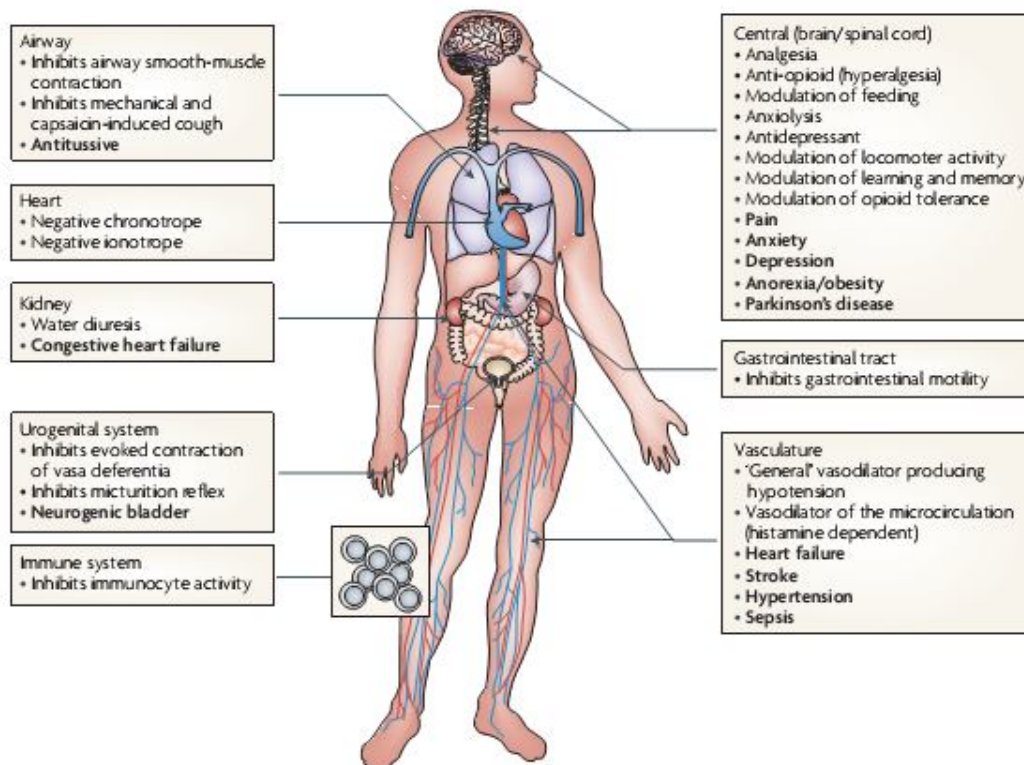


Figura 5: Principali attività biologiche del sistema N/OFQ-recettore NOP (da Lambert et al., *Nature Reviews Drug Discovery* 2008; 7:694-710).

Effetti soprasspinali

Somministrazioni soprasspinali (ICV) di N/OFQ causano nel topo e nel ratto un aumento della sensibilità a stimoli dolorifici in diversi tests (piastra calda e “tail-flick”), che si manifesta con effetto pro-nocicettivo, iperalgesico o pro-allodinico (Meunier et al., 1995; Reinscheid et al., 1995; Zeilhofer & Calò, 2003).

La modulazione soprasspinale del dolore da parte di N/OFQ rappresenta una forma di “antagonismo funzionale del sistema oppioide”; la N/OFQ, infatti, è in grado di contrastare l’effetto analgesico indotto dalla somministrazione di agonisti oppioidi (Calò et al., 1998; King et al., 1998; Mogil & Pasternak, 2001; Zeilhofer & Calò, 2003; Scoto et al., 2007). N/OFQ, ICV, blocca anche l’analgesia indotta da stress e da

elettroagopuntura, eventi entrambi associati al rilascio di peptidi oppioidi (Rizzi et al., 2001; Ma et al., 2004).

Inoltre, recenti studi dimostrano che antagonisti peptidici del recettore NOP somministrati per via centrale sono anti-nocicettivi, evidenziando così l'esistenza di un tono centrale endogeno N/OFQergico anti-oppioide/pronocicettivo in condizioni di base (Chiou et al., 2007) che viene anche attivato in condizione di infiammazione cronica o neuropatia (Scoto et al., 2009).

Effetti spinali

A livello spinale, l'azione di N/OFQ è più complessa in quanto il peptide induce effetti diversi al variare della dose: iperalgesia a basse dosi ed analgesia a dosi più elevate (Mogil & Pasternak, 2001).

Nonostante le numerose contraddizioni, riportate in letteratura, la maggior parte dei lavori, effettuati in differenti specie animali e in differenti modelli di dolore (calore, stimoli meccanici, infiammazione e neuropatia) riporta, che somministrazioni spinali (intratecali, IT) di N/OFQ causano effetti analgesici (Ko et al., 2006; Mogil & Pasternak, 2001; Courteix et al., 2004).

Effetti periferici

Ad oggi, anche le informazioni relative agli effetti di somministrazioni periferiche di N/OFQ e dei suoi analoghi nel controllo del dolore sono controverse. In generale, comunque, si evince che N/OFQ (intraplantare, IPL) abbia un'azione analgesica sul dolore indotto da sostanza P nel riflesso flessorio del topo (Inoue et al., 1999), così come nel dolore termico causato da una somministrazione sottocutanea di capsaicina nella coda di scimmia (Ko et al., 2002).

Nel dolore di tipo infiammatorio, indotto da formalina nel ratto, l'attivazione dei recettori NOP periferici riduce sia lo sviluppo che il perdurare dello stato doloroso, a differenza degli oppioidi che hanno un'importante azione analgesica solamente nelle fasi iniziali dell'infiammazione (Ambriz-Tututi et al., 2009). Nel ratto, la somministrazione di un agonista di sintesi del recettore NOP, Ro64-6198, produce un effetto anti-allodinico in un modello di dolore neuropatico (Obara et al., 2005), mentre nel topo produce effetti contraddittori anti- e pro-algesici in funzione delle condizioni sperimentali (Reiss et al., 2008).

Attività locomotoria spontanea

Sia nel topo che nel ratto, basse dosi ICV di N/OFQ stimolano l'attività locomotoria spontanea e il comportamento esplorativo (in relazione probabilmente all'effetto ansiolitico del peptide), mentre dosi più alte riducono l'attività locomotoria in maniera dose-dipendente causando atassia, perdita della coordinazione, dell'equilibrio e del tono muscolare. Così come altri effetti indotti da N/OFQ, l'inibizione dell'attività locomotoria è insensibile al naloxone (Reinscheid et al., 1995; Devine et al., 1996; Jenck et al., 1997; Rizzi et al., 2001; Marti et al., 2009).

Studi condotti impiegando topi knock out per il recettore NOP o antagonisti selettivi dimostrano che, nel topo, il sistema N/OFQ- recettore NOP non gioca un ruolo endogeno nella regolazione dell'attività locomotoria (Noda et al., 2000; Rizzi et al., 2001). Nel ratto, invece, la stimolazione della performance motoria indotta dalla somministrazione di UFP-101, un antagonista altamente selettivo per i recettori NOP, suggerisce un ruolo endogeno inibitorio del sistema N/OFQ-NOP nel controllo di tale funzione (Marti et al., 2009).

Rilascio di neurotrasmettitori

Studi *in vitro* mostrano che N/OFQ inibisce il rilascio di noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina e glutammato in diverse aree cerebrali di molte specie animali (Schlicker & Morari, 2000).

Studi *in vivo* confermano il ruolo modulatorio di N/OFQ sul rilascio di numerosi neurotrasmettitori nel sistema nervoso centrale. Ad esempio, nel ratto anestetizzato, N/OFQ, iniettata ICV, riduce il rilascio di dopamina nel nucleus accumbens (Norton et al., 2002). Altri studi *in vivo* hanno al contrario dimostrato che N/OFQ, somministrata per via ICV, di per sé non è in grado di modificare la liberazione di dopamina nel nucleus accumbens, ma previene l'aumento della liberazione di dopamina, provocato dalla morfina somministrata per via sistemica (Di Giannuario et al., 1999). L'inibizione delle fibre mesocortico-limbiche dopaminergiche da parte di N/OFQ ben si accorda con altre osservazioni sperimentali che la vedono coinvolta in meccanismi di gratificazione, cognitivi e di controllo motorio, che trovano sede principale proprio nel sistema mesocortico-limbico (Mollereau et al., 2000).

N/OFQ somministrata per via ICV inibisce, in ratti svegli, le vie dopaminergiche nigrostriatali; tale ruolo potrebbe rappresentare, in un prossimo futuro, la base di terapie farmacologiche con antagonisti NOP per il trattamento del Parkinson (Marti et al., 2004). A questo proposito, un trial clinico di fase I è iniziato nel 2008 per lo studio dell'impiego di un antagonista specifico del recettore NOP, SB-612111 (Glaxo SmothKline) nella terapia di questa malattia (Lambert et al., 2008).

N/OFQ, inoltre, inibisce la liberazione di serotonina da fettine di corteccia cerebrale di ratto e tale effetto si può mettere in relazione con l'azione ansiolitica del peptide (Siniscalchi et al., 1999; Le Maitre et al., 2005).

Apprendimento e memoria

Il sistema N/OFQ-recettore NOP, ampiamente distribuito in regioni corticali e limbiche (Neal Jr et al., 1999), è coinvolto nella regolazione dell'apprendimento e della memoria (Mamiya et al., 2003). Diversi studi riportano un peggioramento delle capacità di apprendimento nel test di Morris water maze, in seguito ad infusione intra-ippocampale di N/OFQ che viene completamente bloccato con il pre-trattamento con un antagonista selettivo del recettore (Sandin et al., 1997; Reprobe et al., 2000). Inoltre, topi knockout per N/OFQ posseggono maggiore capacità di apprendimento e una migliore memoria rispetto ai topi normali, che mette in evidenza il ruolo inibitorio del sistema N/OFQergico endogeno in tali funzioni (Noda et al., 2000).

Ansia e depressione

Basse dosi ICV del peptide attenuano le risposte comportamentali allo stress in diversi modelli ansiogenici in topi e ratti (Jenck et al., 1997). Altri studi, tuttavia, riportano che N/OFQ somministrata ICV, nel ratto, incrementa la suscettibilità allo stress e mostra proprietà ansiogene (Fernandez et al., 2004). Il ruolo antistress o ansiolitico di N/OFQ somministrata ai roditori, è stato confermato in topi knockout per N/OFQ che manifestano una maggiore ansia quando posti in un ambiente nuovo o minaccioso, hanno un ridotto comportamento esplorativo e spendono meno tempo al centro dell'area nell'*open field test* (Köster et al., 1999; Gavioli et al., 2007). Le

proprietà ansiolitiche del peptide endogeno si riscontrano anche utilizzando un agonista non-peptidico (Ro 64-6198, Roche) (Jenck et al., 2000).

Il meccanismo attraverso cui N/OFQ produce un effetto ansiolitico non è del tutto definito; è stato ipotizzato che l'azione si realizzi attraverso la modulazione di sistemi notoriamente coinvolti nel controllo dell'ansia come il sistema serotoninergico (Siniscalchi et al., 1999; Le Maître et al., 2005), CRF (Jenck et al., 1997) e GABA_A (Gavioli et al., 2008).

Il sistema N/OFQ-recettore NOP induce un effetto depressivo (Redrobe et al., 2002). E' stato dimostrato che nella fase di depressione post-partum i livelli plasmatici di N/OFQ aumentano ed esercitano un'azione inibitoria sul rilascio di catecolamine e serotonina (5-HT) nel locus caeruleus e nel nucleo del raphe. Gli antagonisti NOP permettono di ristabilire i livelli fisiologici di catecolamine e 5-HT in queste aree cerebrali (Connor et al., 1996) confermando una mediazione NOP.

Nonostante siano necessari ulteriori studi per meglio definire il ruolo del sistema N/OFQ-recettore NOP sul controllo di queste patologie, è ampiamente accettata l'ipotesi generale che gli agonisti del recettore NOP siano ansiolitici, mentre gli antagonisti siano anti-depressivi. A questo proposito le molecole candidate per iniziare una sperimentazione clinica per il trattamento della depressione (Lambert et al., 2008) sono Ro64-6198 (Roche), agonista selettivo del recettore NOP, che mostra un buon profilo ansiolitico e SB-612111 (GlaxoSmithKline), antagonista selettivo NOP.

Droghe d'abuso

N/OFQ regola l'assunzione di alcool e il comportamento associato al suo consumo; in particolare l'attivazione del recettore NOP inibisce l'autosomministrazione di alcool e riduce il Conditioned Place Preference indotto da etanolo (Ciccocioppo et al., 2004; Kuzmin et al., 2007). Inoltre, è stato dimostrato che la somministrazione ICV di N/OFQ riduce il consumo di etanolo in un ceppo di ratti geneticamente selezionato per la preferenza all'alcool (Marchigian Sardinian msP alcohol-preferring) (Economidou et al., 2006).

E' stato riportato, inoltre, che N/OFQ inibisce il reward verso l'assunzione di alcune sostanze d'abuso quali, anfetamina, cocaina e morfina (Kotlinska et al., 2003; Toll et al., 2009).

Assunzione di cibo

N/OFQ è sintetizzata e rilasciata in molte zone del cervello coinvolte nel controllo dell'assunzione di cibo (striato, ipotalamo, tratto solitario, nucleo parabranchiale).

N/OFQ stimola l'assunzione di cibo in ratti sazi e tale effetto è antagonizzato sia dal naloxone che dalla somministrazione di antagonisti del recettore NOP (Pomonis et al., 1996; Olszewski & Levin, 2004).

Inoltre, la somministrazione di N/OFQ nel ventricolo laterale produce un significativo incremento del food intake in ratti magri ma non in ratti obesi. Questi dati, di recente pubblicazione, dimostrano la differente sensibilità all'azione di N/OFQ di ratti con un diverso assetto corporeo (Filippetti et al., 2007). Interessante è l'osservazione che nel topo, la somministrazione cronica per via ICV di N/OFQ causa

un incremento del peso corporeo, non solo attraverso l'aumento dell'assunzione di cibo, ma anche mediante la riduzione del metabolismo energetico dei lipidi (Matsushita et al., 2009).

Sistema cardiovascolare e funzioni renali

Una conferma del coinvolgimento del sistema N/OFQergico nella regolazione di funzioni cardiovascolari deriva dalla diffusa distribuzione sia di N/OFQ che del recettore NOP in regioni del sistema nervoso centrale, nucleo del tratto solitario e medulla rostrale ventrolaterale, così come nelle terminazioni pre- e post-gangliari del sistema nervoso autonomo simpatico e parasimpatico che innervano i vasi sanguigni e il cuore, e negli stessi organi bersaglio (Malinowska et al., 2002).

N/OFQ somministrata sia per via IV che per via ICV, induce, nel ratto e nel topo, una transitoria riduzione della pressione arteriosa e della frequenza cardiaca (Giuliani et al., 1997; Burmeister & Kapusta, 2007; Burmeister et al., 2008); inoltre in studi effettuati sia *in vitro* (arterie di gatto e di ratto) che *in vivo* (nel ratto) (Abdelrahman & Pang, 2002) è emersa un'azione vasodilatatrice del peptide. Agonisti recettoriali di questo sistema potrebbero essere efficaci nel trattamento dell'ipertensione.

Il sistema N/OFQ ergico agisce anche a livello renale; infusioni IV e ICV di N/OFQ nel ratto aumentano marcatamente il flusso urinario e hanno un effetto antinatriuretico (Kaptusa et al., 1997; Burmeister & Kapusta, 2007). Agonisti del recettore NOP potrebbero, quindi, essere utili come farmaci diuretici.

N/OFQ e sistema gastrointestinale

Il sistema N/OFQ-recettore NOP è largamente espresso in aree del sistema nervoso centrale e anche in tessuti periferici di molte specie animali (ratto, topo e uomo), capaci di regolare alcune funzioni gastrointestinali, sia in condizioni fisiologiche che patologiche.

(i) *Condizioni fisiologiche*: studi *in vivo* effettuati nel ratto hanno mostrato che N/OFQ e i suoi analoghi di sintesi, tra cui UFP-112, inducono differenti effetti sulle funzioni gastriche a seconda del sito di somministrazione; quando iniettati per via centrale, inibiscono la secrezione acida gastrica e ritardano lo svuotamento dello stomaco, quando somministrati per via periferica, stimolano la secrezione acida gastrica e non hanno alcuna azione sullo svuotamento (Broccardo et al., 2004; Broccardo et al., 2007). Inoltre, N/OFQ ritarda lo svuotamento gastrico con un meccanismo dipendente dall'asse ipotalamo-ipofisi-surrene (HPA, acronimo dell'inglese Hypothalamic Pituitary Adrenal), nel quale sia il CRF che i glucocorticoidi giocano un ruolo facilitatorio. (Broccardo et al., 2005).

Il sistema N/OFQ-recettore NOP centrale controlla in senso inibitorio l'attività propulsiva colonica in diverse specie animali e tale effetto è mediato dal recettore NOP (Osinski et al., 1999; Osinski et al., 2000; Broccardo et al., 2004).

Più controversi sono, invece, gli effetti sull'attività propulsiva colonica del sistema N/OFQergico periferico; uno studio sul ratto ha dimostrato che, analogamente a quando avviene a livello centrale, anche a livello periferico, N/OFQ induce un effetto antipropulsivo (Broccardo et al., 2008). Altri lavori invece hanno messo in evidenza che N/OFQ stimola perifericamente la propulsione colonica (Taniguchi et

al., 1998; Takahashi et al., 2000). Questa discrepanza potrebbe dipendere dalle diverse condizioni sperimentali usate in tali studi (dose, via di somministrazione, tipologia dei saggi utilizzati).

(ii) *Condizioni patologiche*: somministrazioni centrali e periferiche di N/OFQ proteggono la mucosa dall'azione erosiva dell'etanolo (soluzione al 50% in fisiologica) e tale effetto non sembra essere legato all'attivazione dell'asse HPA e dei suoi componenti principali (CRF e glucocorticoidi) (Grandi et al., 2008).

N/OFQ, iniettata sia centralmente che perifericamente, riduce, nel ratto, l'incidenza di diarrea indotta da olio di ricino, principalmente come conseguenza della capacità del neuropeptide di inibire il transito colonico, sebbene non si possa escludere una contemporanea azione antisecretoria (Broccardo et al., 2008).

(iii) *Condizioni di stress*: Il sistema N/OFQ-recettore NOP svolge un ruolo modulatore anche in alcune disfunzioni gastrointestinali indotte da stress.

Prove sperimentali e cliniche dimostrano che lo stress è causa di disfunzioni dell'attività secretoria, motoria ed epiteliale del tratto gastrointestinale. La maggiore incidenza di lesioni della mucosa, l'aumento del transito colonico e dell'escrezione fecale, insieme alla significativa riduzione della soglia di sensibilità alla distensione colon rettale (CRD) (indice di sensibilità dolorosa viscerale) rappresentano le principali alterazioni durante i più comuni disturbi gastrointestinali legati allo stress (Bonfils et al., 1993; Lenze et al., 1998; Gue et al., 1997; Tache et al., 2004; Agostani et al., 2009).

La somministrazione periferica di N/OFQ o di agonisti selettivi (UFP-112), riduce, attraverso l'attivazione dei recettori NOP, le lesioni gastriche indotte da "stress

da freddo”, favorendo la produzione di muco (Grandi et al., 2007). Inoltre, N/OFQ con meccanismi periferici riduce l’escrezione fecale evocata da stress o da somministrazioni di CRF, riduce a livello periferico l’ipersensibilità viscerale alla CRD indotta da “stress da restrizione” e, infine, protegge la mucosa colonica dai danni indotti dallo stress (Broccardo et al., 2008; Agostini et al., 2009).

Alla luce di tutte queste premesse, e considerando, inoltre, che differenti tipi di stress possono aggravare i sintomi clinici di pazienti con malattie infiammatorie intestinali, quali il morbo di Crohn e la Colite Ulcerosa, gli effetti di N/OFQ messi in evidenza sul tratto gastrointestinale (protezione della mucosa gastrica e colonica, rallentamento della propulsione del colon ed analgesia viscerale), rappresentano importanti componenti a favore di un ruolo modulatorio di questo sistema in disfunzioni gastrointestinali.

N/OFQ e sistema immunitario

Il sistema immunitario rappresenta un altro importante sito di localizzazione del sistema N/OFQergico; mRNA del recettore NOP e del precursore proteico di N/OFQ, ppN/OFQ, sono stati identificati in diverse sottopopolazioni linfocitarie di topo (CD4+,CD8+,CD4-,CD8-) così come in molte cellule immunitarie umane, inclusi monociti, linfociti e cellule polimorfonucleate (Halford et al., 1995; Peluso et al., 1998; Arjomand et al., 2002; Williams et al., 2007). Il coinvolgimento del sistema N/OFQ-recettore NOP nella modulazione della risposta immunitaria è, inoltre, avvalorato dall’osservazione che diversi stimoli infiammatori favoriscono il rilascio di N/OFQ dagli immunociti e che N/OFQ, a sua volta, modula il rilascio di alcuni mediatori dell’infiammazione (Fiset et al., 2003; Miller et al., 2007). Ad oggi, il ruolo

del sistema N/OFQergico nell'infiammazione è ancora controverso dal momento che N/OFQ induce sia effetti pro- che anti-infiammatori.

- i. *effetti anti-infiammatori*: N/OFQ inibisce l'incremento di citochine pro-infiammatorie indotto da uno stress traumatico, la produzione di anticorpi a livello linfocitario e l'attivazione mastocitaria (Halford et al., 1995; Peluso et al., 2001; Zhao et al., 2002). Inoltre il peptide sopprime la produzione di alcune chemochine pro-infiammatorie (CCL2/MCP-1 e CCL5/RANTES) da monociti umani (Kaminsky et al., 2008). Complessivamente, possiamo, quindi, affermare che la N/OFQ induce l'effetto anti-infiammatorio, attraverso l'inibizione della produzione di mediatori della risposta immunitaria.
- ii. *effetti pro-infiammatori*: N/OFQ aumenta i livelli plasmatici di TNF α e IL-1 β e la mortalità degli animali in un modello di sepsi da legatura e puntura del cieco (Carvalho et al., 2008). Inoltre, topi knockout per il recettore NOP sono resistenti all'induzione di colite sperimentale indotta da somministrazione orale di destranosolfato di sodio (DSS) (Kato et al., 2005) e la somministrazione di un antagonista non peptidico dei recettori NOP, (SB612111), ha un'azione protettiva sulla colite da DSS (Alt et al., 2012).

In linea con l'azione pro-infiammatoria del peptide è stato recentemente dimostrato che, alte dosi di N/OFQ inducono, in ratti sani, un aumento della vasodilatazione del microcircolo mesenterico, del rolling e dell'adesione leucocitaria e dell'espressione di molecole di adesione (CD11b) sulla superficie di neutrofili circolanti, attraverso tappe che coinvolgono l'attivazione mastocitaria (Brookes et al., 2007).

Malattie infiammatorie intestinali

Le Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali (IBD, acronimo dell'inglese *Inflammatory bowel Disease*), come il morbo di Crohn e la Colite Ulcerosa, sono patologie croniche, infiammatorie, idiopatiche, che colpiscono il tratto gastrointestinale (GI). Queste patologie, risultano essere particolarmente debilitanti e severe per la natura dei sintomi che le caratterizzano, per la compromissione della qualità di vita, per il decorso cronico, e per il rischio, tanto più rilevante nei casi ad esordio in età pediatrica, di complicazioni a lungo termine (deficit di crescita, cancerizzazione, necessità di interventi chirurgici anche demolitivi).

Le IBD rappresentano la più comune classe di patologie infiammatorie croniche dopo l'artrite reumatoide, raggiungendo nei paesi economicamente più sviluppati, una prevalenza complessiva pari allo 0,5-1% della popolazione generale; attualmente in Europa si contano circa 2.2 milioni di persone affette da queste patologie. Numerosi studi epidemiologici hanno, inoltre, rilevato un costante aumento nell'incidenza di queste patologie, che ha coinvolto non solo le aree tradizionalmente più colpite dove ora l'incidenza sembra aver raggiunto un plateau, ma anche i paesi del bacino del Mediterraneo, dell'ex Europa comunista, Cina ed India, portando ad una riduzione del gradiente d'incidenza Nord-Sud precedentemente osservato (Cosnes et al., 2011) [Figura 6].

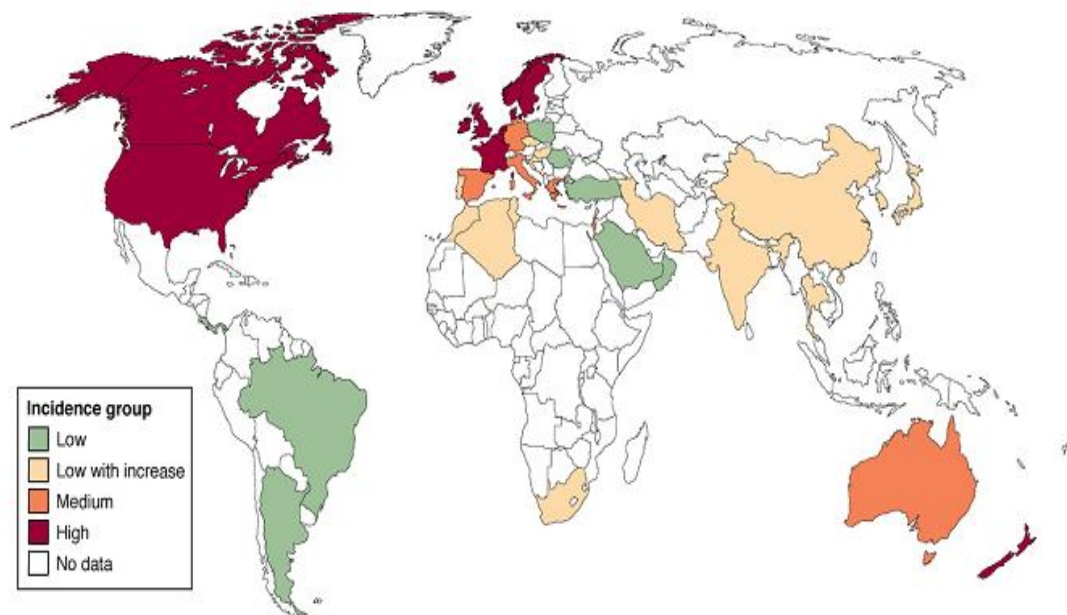


Figura 6: Incidenza annuale delle Malattie Infiammatorie Croniche Intestinali nel mondo; in rosso: incidenza maggiore di 10/10.000/anno; in arancione: incidenza 5-10/10.000/anno; in verde incidenza minore di 4/10.000/anno; in giallo: incidenza minore di 4/10.000/anno ma in costante aumento; in bianco: dati non disponibili (da Cosnes et al., Gastroenterology 2011; 140:1785-1794).

Sebbene tutti i gruppi di età siano a rischio di IBD, il riscontro di queste patologie in soggetti al di sotto dei 10 anni e al di sopra degli 80 anni è piuttosto raro. Generalmente vengono colpiti i giovani adulti e il picco maggiore di esordio di queste due malattie si colloca tra 15 e 35 anni per l'uomo e tra 20 e 40 anni per la donna, con un secondo picco comune tra i 50 anni, che mostra un andamento bimodale.

La malattia di Crohn e la Colite Ulcerosa hanno alcune somiglianze nel meccanismo patologico e nel decorso clinico (dolore addominale, perdita di peso, diarrea e sanguinamento rettale), tuttavia rimangono sindromi distinte caratterizzate da modalità di distribuzione dell'infiammazione, prognosi e approcci terapeutici almeno in parte diversi.

Il morbo di Crohn può interessare tutto il tratto gastroenterico, dalla bocca all'ano, con una predilezione per la porzione distale dell'intestino tenue e per il colon

prossimale, mentre la Colite Ulcerosa colpisce tipicamente il retto interessando con un'estensione in senso prossimale diversi segmenti del solo colon. L'inflammazione nella malattia di Crohn presenta, inoltre, come caratteristiche fondamentali, la distribuzione endoscopica discontinua e il coinvolgimento di tutti gli strati della parete intestinale, dalla mucosa alla sierosa; nella Colite Ulcerosa, invece, il coinvolgimento infiammatorio è limitato agli strati superficiali, e, solitamente, non supera la mucosa e ha un pattern endoscopico di continuità; le alterazioni anatomo-patologiche interessano, infatti, la mucosa in maniera continua ed uniforme senza interposizione di aree di mucosa integra, come avviene, invece, nella malattia di Crohn. Un'altra differenza tra queste due patologie riguarda il profilo delle citochine liberate nella mucosa intestinale infiammata. Linfociti CD4⁺ isolati da pazienti affetti da morbo di Crohn mostrano, infatti, un profilo simil-Th1 (linfociti T-helper 1), caratterizzato dalla produzione predominante di IFN- γ , IL-2 e TNF- α . Al contrario, i linfociti CD4⁺ isolati da pazienti affetti da Colite Ulcerosa hanno un profilo simil-Th2 (linfociti T-helper 2), caratterizzato da elevata produzione di IL-5.

Le cause delle IBD non sono ancora note. Gli studi condotti evidenziano un coinvolgimento di fattori genetici, ambientali, microbici e immunologici, ma i precisi meccanismi eziopatogenetici risultano essere ancora oscuri. L'ipotesi attualmente più accreditata è che le IBD siano il risultato di una inappropriata ed esagerata risposta immune verso i normali costituenti della microflora della mucosa intestinale, indotta da un agente esterno in individui geneticamente predisposti.

La suscettibilità genetica viene confermata da numerose evidenze cliniche e sperimentali, che dimostrano un'aumentata incidenza delle malattie tra i familiari di

primo grado dei pazienti con IBD, tra gemelli monozigoti rispetto ai dizigoti ed alterazioni genetiche in particolari cromosomi (loci IBD) (Ahmad et al., 2004; Orholm et al., 2000). Recentemente la mappatura del cromosoma 16 ha permesso l'identificazione del gene NOD2 (nucleotide-binding oligomerization domain-containing protein 2), anche noto come CARD15 (caspase-recruitment domain protein), le cui mutazioni sono correlate alla comparsa di IBD. In condizioni "fisiologiche" questo gene codifica per una proteina citoplasmatica presente sui macrofagi, detta NOD2, che costituisce un recettore intracellulare per componenti lipopolisaccaridici batterici (LPS), con la funzione di modulare la risposta ad antigeni batterici. Il legame di tale proteina con LPS attiva il fattore di trascrizione nucleare κ B (NF- κ B), coinvolto nel segnale della risposta immuno-infiammatoria mucosale che porta alla sintesi di citochine infiammatorie. In pazienti affetti da morbo di Crohn, la proteina NOD2 mutata non permette più ai monociti di riconoscere alcuni agenti patogeni e determina una modifica nell'attivazione di NF- κ B, a sua volta responsabile di un'alterata risposta immune (Lécine et al., 2007; Hugot et al., 2001; Ogura et al., 2001). Dal momento che, però, le mutazioni a carico del gene NOD2 sono responsabili solo del 15% dei casi di malattia, i geni potenzialmente coinvolti potrebbero essere anche altri. A tal proposito, sono stati mappati altri loci che potrebbero essere interessati nello sviluppo del morbo di Crohn a livello del cromosoma 12 (loci IBD2), 6 (loci IBD3) e 14 (loci IBD4) (Ahmad et al., 2001).

La componente genetica comunque è solo uno degli aspetti di questa malattia multifattoriale; l'incompleta concordanza per le IBD nei gemelli omozigoti e la variazione di rischio in alcuni gruppi etnici che vivono in diverse aree geografiche,

infatti, supporta il coinvolgimento di fattori ambientali anche se mancano chiare evidenze causa-effetto.

I fattori ambientali maggiormente implicati sono:

- *Fattori infettivi*: il *Mycobactérium paratuberculosis* (che appartiene allo stesso genere batterico del bacillo della tubercolosi) che sembra potere favorire l'insorgenza della malattia di Crohn, sebbene il suo ruolo primario sia molto contestato. Su 24 studi svolti nei pazienti con malattia di Crohn, tale batterio è stato riscontrato solo in 10 di questi; non si possono tuttavia trarre conclusioni univoche nel coinvolgimento di questo batterio nelle IBD in quanto i pazienti risultati negativi potrebbero in realtà essere dei falsi negativi. Un'altra controversia riguarda l'implicazione del virus del morbillo la cui infezione durante i primi giorni di vita, o addirittura durante il primo trimestre di gravidanza, potrebbe giocare un ruolo nella comparsa 20 o 30 anni dopo la malattia di Crohn.
- *Abitudini alimentari*: nei sieri di pazienti affetti da IBD, sono stati trovati anticorpi diretti contro vari antigeni alimentari, quali proteine del latte, della farina e del lievito di pane. Il ruolo degli alimenti nell'indurre una flogosi della mucosa è stato avvalorato da studi che hanno evidenziato l'efficacia della dieta alimentare nella remissione della malattia.
- *Utilizzo di alcuni farmaci* entero-lesivi, come FANS ed antibiotici.
- *Il fumo di sigaretta*: il fumo innalza di tre-quattro volte il rischio di sviluppare la malattia di Crohn oltre a causarne un decorso clinico più impegnativo. Al contrario nella Colite Ulcerosa i soggetti più a rischio sono sia gli ex fumatori

che i non fumatori. L'associazione inversa in questo caso tra fumo e malattia ha tuttavia meccanismi complessi e poco chiari, legati ai possibili effetti della nicotina sulla secrezione di muco, sulla risposta immunitaria, sull'attività meccanica e sulla regolazione del circolo ematico locale (Selby et al., 2003; Cosnes 2004; Lakatos et al., 2007).

- *Lo stress psicologico* è stato da sempre riportato come un elemento scatenante le IBD, probabilmente attraverso alterazioni della risposta immunitaria (Herbert et al., 1993). Sulla base delle attuali conoscenze, non si può, tuttavia, escludere che lo stress, in realtà, sia un fenomeno secondario all'essere affetti da una malattia cronica, ad eziologia ignota e anche potenzialmente invalidante, soprattutto in età giovanile.
- Un importante ruolo viene anche attribuito alla *flora intestinale*. I batteri nel lume hanno un complesso ecosistema che è in continuità con l'ambiente esterno. Studi eseguiti su modelli animali di colite hanno evidenziato l'importanza di questi batteri nello sviluppo delle IBD. Lo sviluppo di colite "spontanea" nel ratto e nel topo necessita della presenza della flora batterica, poiché la colite non si sviluppa in ceppi mutanti mantenuti in un ambiente privo di patogeni, mentre si sviluppa rapidamente quando gli animali sono colonizzati da batteri commensali. Si può supporre che la flora intestinale sia necessaria per innescare o mantenere il processo infiammatorio presumibilmente fornendo antigeni o cofattori che inducono la risposta immunitaria in un soggetto geneticamente predisposto. L'utilizzo di antibiotici ad ampio spettro e di probiotici si è dimostrato clinicamente efficace in gruppi

di pazienti con IBD, che presentano un maggiore numero di batteri a livello dell'epitelio del colon (Podolsky et al., 2002).

In sintesi, tutti i dati esposti concorrono nel rendere a tutt'oggi più accreditata l'ipotesi secondo cui alla base delle IBD ci sia una predisposizione genetica responsabile di una risposta immunologica abnorme o inappropriata contro antigeni o agenti non patogeni, o addirittura una risposta autoimmune, nell'ambito della quale i fattori ambientali rappresenterebbero l'elemento scatenante o modulatore.

Strategie terapeutiche nelle IBD

La natura cronica e intermittente delle IBD impone trattamenti a lungo termine condotti il più delle volte con l'alternanza e/o associazione di più farmaci. L'obiettivo nella terapia farmacologica acuta, è la risoluzione dei sintomi e delle alterazioni istologiche ed endoscopiche presenti, e, in quella cronica, il mantenimento della remissione attraverso la prevenzione delle ricadute. Gli agenti farmacologici impiegati nel trattamento di queste patologie intestinali sono rappresentati dagli aminosalicilati, dai corticosteroidi e dagli immunomodulatori, la scelta dei quali dipenderà dall'obiettivo clinico (induzione o mantenimento della remissione), dall'estensione e severità dello stato morbosità e dalle eventuali presenze di complicanze (Lim et al., 2004).

- i. Aminosalicilati (*salazopirina*, *mesalazina*): derivati dell'aspirina, somministrati per via orale e/o rettale. Il primo farmaco utilizzato nella Colite Ulcerosa poi nella malattia di Crohn è stato la *salazopirina* introdotta dall'industria farmaceutica Schwarz nel 1938. Questo farmaco è formato da un vettore rappresentato dal sulfamidico (sulfapiridina) responsabile di numerosi

effetti collaterali, e dal principio attivo con azione antiinfiammatoria (mesalazina). A partire dagli anni '80 è stato introdotto in terapia l'*acido amino salicilico* (5-ASA) che rappresenta un'evoluzione rispetto alla *salazopirina* in quanto priva del vettore e costituita esclusivamente dalla parte attiva (*mesalazina*). Gli aminosalicilati risultano essere i farmaci d'elezione per il trattamento delle forme lievi di Colite Ulcerosa, mentre si sono rilevati poco efficaci per il trattamento del morbo di Crohn.

ii. Corticosteroidi (*idrocortisone, prednisone e metilprednisolone*): sono farmaci di scelta per il trattamento delle forme moderate e severe, specie in fase acuta, sia del Colite Ulcerosa che del morbo di Crohn, o dei pazienti che non rispondono alla terapia con aminosalicilati. Vengono somministrati per via orale, parenterale o rettale, e circa l'80% dei pazienti risponde positivamente, con una sostanziale riduzione della mortalità connessa alle fase di massima gravità di queste malattie. Il principale limite all'impiego dei corticosteroidi sono i pazienti che possono sviluppare dipendenza (fino al 30-40%) e gli inevitabili effetti indesiderati che si verificano col prolungarsi della terapia. Per questo motivo i corticosteroidi vengono somministrati per brevi periodi di tempo fino alla risoluzione dei sintomi di maggiore attività della malattia per continuare poi con gli aminosalicilati.

iii. Immunomodulatori (*azatioprina, 6-mercaptopurina, ciclosporina, metotressato*): nei pazienti steroide-dipendenti e resistenti è stato poi introdotto l'utilizzo di immunostimolanti che sono però caratterizzati da una comparsa d'azione lenta e da seri effetti collaterali. La *6 mercaptopurina*, e il

suo pro-farmaco, *azatioprina*, sono capaci di ridurre la risposta immunitaria e vengono utilizzati nelle IBD con tre indicazioni principali: (i) terapia di mantenimento nei pazienti allergici ai salicilati; (ii) sospensione e riduzione del fabbisogno di cortisone nelle forme steroide-dipendenti sia in fase di remissione che nel mantenimento (soprattutto nella malattia di Crohn). Sono farmaci ben tollerati sebbene a volte compaia pancreatite. Altri tipi di immunomodulatori utilizzati sono la *ciclosporina* e il *metrotrexato*. La *ciclosporina* ha un'azione più rapida e trova impiego nel trattamento delle forme gravi di Colite Ulcerosa e morbo di Crohn, non rispondenti alla terapia convenzionale. Tuttavia il suo utilizzo deve essere accompagnato dal monitoraggio dei livelli sierici dei suoi metaboliti attivi, per evitare il raggiungimento di concentrazioni tossiche e potenziali rischi di ipertensione, nefrotossicità, squilibri elettrolitici ed infezioni. Il *metrotrexato* determina una cospicua inibizione del sistema immunitario ed è stato recentemente indicato per il trattamento del morbo di Crohn steroide-dipendente poiché, in tale condizione, è in grado di indurre e di mantenere la remissione, anche se il suo impiego è limitato dal rischio potenziale di mielodepressione, epatotossicità, effetti teratogeni ed abortigeni (Lim et al., 2004).

- iv. Farmaci biologici: la scarsa efficacia e la limitata sicurezza riscontrate nelle terapie farmacologiche impiegate nel trattamento delle IBD, hanno stimolato la ricerca di più efficaci agenti terapeutici. In passato il trattamento farmacologico era focalizzato sulla soppressione non specifica del processo infiammatorio, mentre le attuali conoscenze relative all'immunopatogenesi delle IBD hanno consentito l'introduzione di una vasta gamma di agenti

biologici quali vaccini, anticorpi e proteine ricombinanti, che modulano i mediatori stessi dell'infiammazione. Grazie alla loro elevata specificità d'azione molecolare i farmaci biologici sembrano, dunque, rappresentare la soluzione futura per il trattamento di molte patologie infiammatorie, anche se economicamente molto onerosi.

Il primo farmaco biologico per le IBD entrato in commercio è l'*infliximab*, utilizzato in Europa da quattro anni. L'*infliximab* è un anticorpo monoclonale ad azione specifica nei confronti di una citochina, il TNF- α , che riveste un ruolo fondamentale nell'infiammazione. Questo farmaco si lega sia al TNF α circolante sia al TNF α legato alle membrane cellulari, neutralizzandone gli effetti pro-infiammatori. Studi controllati ne hanno dimostrato l'efficacia nel 60-70 % dei casi di malattia di Crohn refrattaria alle terapie tradizionali.

Negli ultimi 2-3 anni, inoltre, i risultati delle ricerche di base hanno consentito la messa a punto di altri farmaci biologici attualmente in fase di sperimentazione clinica. Alcuni di essi agiscono bloccando il TNF- α (per esempio adalimumab e CDP870), altri interagiscono con altre molecole coinvolte nel processo infiammatorio (come il natalizumab, che blocca le molecole di adesione). Ci troviamo dunque di fronte a una vera e propria rivoluzione nell'ambito della terapia medica di queste malattie: dall'utilizzo di farmaci con azione anti-infiammatoria aspecifica, utilizzati anche in altre malattie, si è passati a farmaci selettivi, con meccanismo d'azione specifico. Restano però numerosi problemi che ne limitano l'uso o ne consigliano un utilizzo prudente: i costi dei trattamenti, la possibilità di sviluppare una reazione specifica

contro questi stessi, il rischio di complicanze infettive e la mancanza di dati definitivi sugli effetti collaterali e su eventuali complicanze a lungo termine.

Modelli di infiammazione intestinale

Nel corso degli anni, lo sviluppo di modelli sperimentali di infiammazione intestinale ha contribuito alla maggiore comprensione dei meccanismi eziopatogenetici delle malattie infiammatorie intestinali e anche al loro trattamento.

Un modello sperimentale ottimale dovrebbe possedere alcune caratteristiche: l'intestino dovrebbe esibire alterazioni morfologiche, stato infiammatorio, sintomi, fisiopatologia e decorso identici a quelle delle IBD umane; la specie animale utilizzata dovrebbe avere un background genetico ben definito ed un sistema immunitario ben caratterizzato; i reagenti utilizzati dovrebbero essere facilmente reperibili.

I modelli animali di infiammazione intestinale sono stati suddivisi in cinque differenti categorie: (i) modelli di geni knockout (KO); (ii) modelli di topi e ratti transgenici; (iii) modelli di colite spontanea; (iv) modelli di colite inducibile (di tipo chimico e di tipo immunologico); e (v) modelli di trasferimento adottivo (Jurjus et al., 2004). La scelta del modello sperimentale da utilizzare dipenderà dall'obiettivo dello studio: per esempio per testare l'attività di nuovi farmaci antiinfiammatori sono adatti modelli riproducibili che coinvolgono solo infiammazione non specifica, mentre, per lo studio della suscettibilità genetica o dell'immunità acquisita si richiede necessariamente l'utilizzo di modelli più complessi in cui si possano studiare queste componenti.

La nostra attenzione si è focalizzata su un modello sperimentale di colite indotta tramite l'infusione dell'acido 2,4,6 trinitrobenzenesolfonico (TNBS). Questo modello

è ampiamente utilizzato in ambito scientifico per lo studio delle IBD, per la sua semplicità, riproducibilità e adattabilità ad animali di piccola taglia. La colite viene indotta in seguito alla somministrazione intrarettale di TNBS, un allergene sensibilizzante da contatto, in una soluzione al 50% di etanolo, la cui funzione è quella di permettere, grazie alla sua azione lesiva sull'epitelio, la penetrazione del TNBS attraverso la parete intestinale (Morris et al., 1989). La suscettibilità degli animali al TNBS è variabile, ma generalmente si sviluppa un'ipersensibilità di tipo ritardato che progredisce in colite cronica (Jurjus et al., 2004).

Tale modello viene in genere utilizzato nell'indagine clinica per lo sviluppo ed il saggio di molecole di potenziale utilizzo nel trattamento delle patologie umane; la Nimesulide, ad esempio, durante infiammazione acuta da TNBS, riduce, nel ratto, la formazione di edema infiammatorio, probabilmente attraverso l'inibizione della produzione di prostaglandina E2 a livello del pathway della COX-2 (Kankuri et al., 2001). Inoltre, gli antagonisti non selettivi del recettore dell'endotelina (ET)a/b migliorano la progressione del danno tissutale, se somministrati prima dell'induzione della colite (McCartney et al., 2002). Ancora, l'utilizzo di immunomodulatori determina una riduzione del danno epiteliale indotto da TNBS (Higa et al., 1993).

Nella maggior parte degli studi la colite viene indotta da una singola somministrazione di TNBS ed è necessario un periodo di 8 settimane per la completa risoluzione del processo infiammatorio. In seguito all'infusione dell'aptene, da un punto di vista istopatologico, si assiste ad un ispessimento della parete colonica, all'infiltrazione di un elevato numero di cellule infiammatorie e alla formazione di ulcere diffuse e granulomi; da studi *in vitro*, è emerso che i macrofagi isolati

producono grandi quantità di IL-12, mentre i linfociti secernono IFN- γ e IL-2; le evidenze scientifiche citate suggeriscono che la colite in questo modello sia mediata da una risposta simil –Th1, costituendo quindi un modello di morbo di Crohn (te Velde et al., 2006; Jurjus et al., 2004; Camoglio et al., 2000; Neurath et al., 1995).

Studi di riattivazione del processo infiammatorio, ottenuta con una seconda somministrazione di TNBS diverse settimane dopo la prima induzione della colite (Gálvez et al., 2003; Wallace et al., 1998; Appleyard et al., 1995), hanno evidenziato un modello cronico di infiammazione con strette somiglianze di tipo istopatologico e clinico con il morbo di Crohn. Esso riproduce il medesimo decorso della malattia, caratterizzata da fasi acute di infiammazione intervallate da periodi più o meno lunghi di remissione della sintomatologia e permette, quindi, di saggiare l'attività di un ampio numero di farmaci antinfiammatori, e di valutarne l'efficacia nella prevenzione della riattivazione del processo infiammatorio.

PREMESSE E SCOPO DEL LAVORO

Nocicettina/orfanina FQ (N/OFQ) e recettori NOP costituiscono un nuovo sistema endogeno di neurotrasmissione (sistema N/OFQergico), largamente espresso in aree del sistema nervoso centrale e anche in tessuti periferici di molte specie animali, che si è dimostrato capace di regolare numerose funzioni gastrointestinali. In particolare, studi *in vivo* riportano che la N/OFQ, attraverso l'attivazione dei recettori NOP centrali e periferici, inibisce il transito colonico, non solo in condizioni fisiologiche ma anche in condizioni di alterata funzionalità gastrointestinale, quali la diarrea indotta da somministrazione di olio di ricino e la defecazione da stress o da somministrazione di CRF (Osinski et al., 1999; Osinski et al., 2000; Broccardo et al., 2004; Broccardo et al., 2008).

Il sistema immunitario rappresenta un altro sito di localizzazione del sistema N/OFQergico; mRNA del recettore NOP e del precursore proteico della N/OFQ (ppN/OFQ) sono espressi in monociti, linfociti e cellule polimorfonucleate (Halford et al., 1995; Peluso et al., 1998; Arjomand et al., 2002; Williams et al., 2007). Ad oggi, i dati sul ruolo del sistema N/OFQergico nella risposta infiammatoria sono controversi: N/OFQ può indurre sia effetti pro- che anti-infiammatori, può agire come immunostimolante e come immunosoppressivo (Zhao et al., 2002; Kaminsky et al., 2008; Carvalho et al., 2008).

Quali siano le possibili interazioni tra malattie infiammatorie intestinali e N/OFQ sono a tutt'oggi ancora scarse. Recentemente è stato mostrato che N/OFQ favorisce lo sviluppo di colite da destranosolfato di sodio (DSS) nel topo, e che, nel ratto con colite infiammatoria da TNBS, N/OFQ riduce l'iperalgia viscerale.

Visto che l'alterata motilità intestinale, il dolore viscerale e lo stato infiammatorio sono caratteristiche comuni a patologie infiammatorie del colon e dell'intestino tenue (Colite Ulcerosa e morbo di Crohn), e che, sperimentalmente nel ratto, queste vengono ben riprodotte nel modello di colite indotta da instillazione di TNBS, scopo del presente lavoro è stato determinare nel ratto:

- i. il ruolo esogeno del sistema N/OFQergico nella colite indotta da TNBS, attraverso lo studio degli effetti di somministrazioni periferiche e ripetute di N/OFQ su alcuni parametri considerati indice di infiammazione (attività della mieloperossidasi colonica, danno istologico colonico macro- e microscopico, livelli di citochine pro- e anti-infiammatorie nella mucosa del colon).
- ii. il ruolo endogeno del sistema N/OFQergico nello stesso modello sperimentale di colite attraverso lo studio degli effetti di somministrazioni periferiche e ripetute dell'antagonista recettoriale selettivo per i recettori NOP, UFP-101, sugli stessi parametri infiammatori e la misurazione dei livelli plasmatici di N/OFQ sia in ratti sani di controllo che in ratti con colite.

MATERIALI E METODI

Animali e induzione della colite

Per la presente ricerca abbiamo utilizzato ratti maschi del ceppo Wistar del peso di 200-250g (Janvier SA, Le Genesi St Isle, France). Dal giorno dell'arrivo nello stabulario, fino ad una settimana successiva, gli animali sono stati posti individualmente in gabbie di plastica contenenti una lettiera di segatura. Il cibo e l'acqua da bere sono stati forniti *ad libitum* e le condizioni di luce (ciclo giorno/notte di 12h), di temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e di umidità ($50 \pm 5\%$) dello stabulario sono state mantenute costanti. La colite post-infiammatoria è stata indotta nei ratti dopo una notte di digiuno; gli animali sono stati anestetizzati con una miscela di ketamina (120 mg/Kg) (Imalgene 1000, Rhone-Merieux, Lyon, France) e acepromazina (0,6 mg/Kg) (Calmivet, Vetoquinol, Lure, France) e successivamente infusi per mezzo di una somministrazione intra-colonica (IC) di TNBS (2,4,6 acido trinitrobenzensolfonico) (Sigma Aldrich, France) alla dose di 60 mg/Kg in 0,3 ml di una soluzione di etanolo al 50%. Il TNBS è stato somministrato per 30 minuti per mezzo di una cannula di silicone introdotta 6 cm nell'ano, come descritto in precedenza (Morteau et al., 1994). Gli animali di controllo sono stati invece infusi con 0.3 ml di una soluzione di salina.

Protocollo sperimentale

Ventiquattro ore dopo l'induzione di colite gli animali sono stati divisi in sottogruppi sperimentali, composti ciascuno da 8 ratti, che hanno ricevuto, per 3 giorni consecutivi, e per due volte al giorno (mattina e sera), un'iniezione intraperitoneale (IP) di (i) salina (NaCl 0.9%), (ii) N/OFQ (0.02 - 0.2 - 2 - 20 nmol/Kg), (iii) UFP-101 (1 - 3 - 10 nmol/Kg), antagonista selettivo dei recettori NOP

o (iv) N/OFQ (0.2 nmol/Kg) + UFP-101 (10 nmol/Kg); UFP101 è stato somministrato 15 minuti prima dell'iniezione di N/OFQ.

Al 4° giorno, gli animali sono stati sacrificati e campioni di colon e di mucosa colonica sono stati prelevati per valutare il danno colonico (analisi istologica macro- e microscopica), l'attività dell'enzima mieloperossidasi (MPO) e i livelli tissutali della citochina pro-infiammatoria (IL-1 β) e anti-infiammatoria (IL-10). Sono stati, inoltre, prelevati campioni di sangue per misurare i livelli plasmatici di N/OFQ in ratti sani di controllo, in ratti con colite e in ratti trattati con UFP-101 (1 - 3 - 10 nmol/Kg) dopo induzione di colite. Durante l'esperimento il consumo di cibo ed il peso di tutti gli animali di ciascun gruppo sperimentale sono stati registrati sia il giorno dell'infusione del TNBS o della salina (D0) che il giorno del sacrificio (D4). N/OFQ e UFP-101 sono stati sintetizzati e purificati presso il Laboratorio Chimico del Dipartimento di Scienza Farmaceutiche e Biotecnologiche dell'Università di Ferrara (Prof. Remo Guerrini).

Sono stati compiuti tutti i possibili sforzi per ridurre al minimo sia il numero di animali utilizzati che le loro sofferenze. Il protocollo sperimentale è stato autorizzato dal Ministero della Sanità (D.n° 70/2000) e dal Comitato locale per la Salvaguardia e l'Utilizzo degli Animali all'interno dell'Istituto Nazionale della Ricerca Agronomica in Francia.

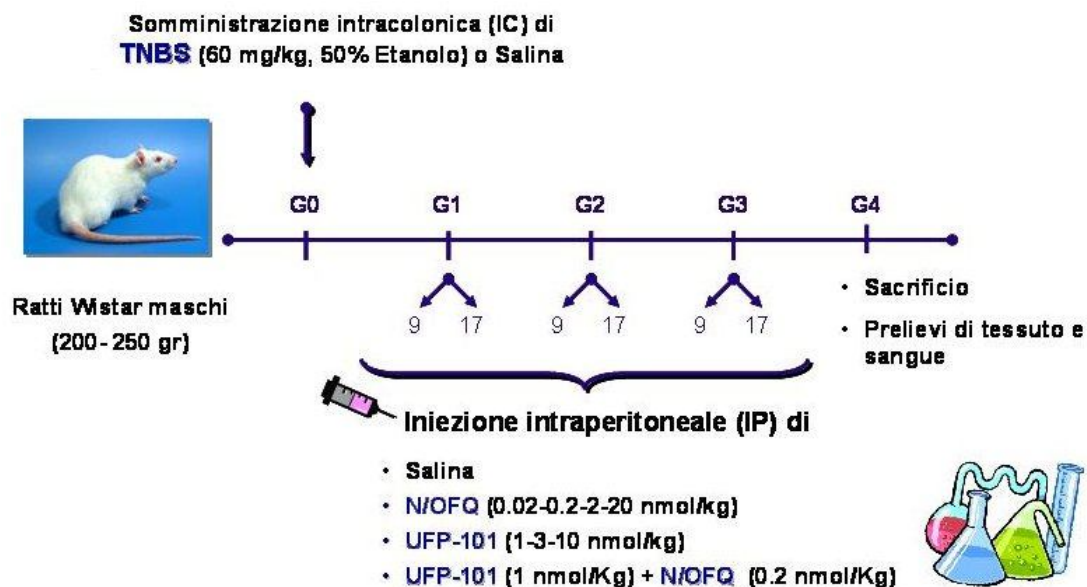


Figura 7: Protocollo sperimentale

Valutazione del danno macroscopico

Immediatamente dopo il sacrificio, il colon è stato rimosso dalla cavità addominale, aperto longitudinalmente e lavato con salina in modo tale da rimuovere il contenuto luminale. Il danno colonico è stato valutato in doppio cieco ed espresso, in accordo con la scala di valutazione di Wallace (Wallace et al., 1992), con uno score che prende in considerazione: (i) la severità e l'estensione delle lesioni macroscopiche (iperemie, ulcere), (ii) la presenza e l'intensità di aderenze tra il colon e altri organi intraddominali, (iii) la comparsa di diarrea.

Valutazione del danno microscopico

Campioni di colon distale sono stati fissati in buffer Duboscq-Brazil, deidratati e fissati in paraffina. Sezioni di colon di 5 μ m sono state poi colorate con ematossilina-eosina ed esaminate al microscopio ottico. L'estensione del danno è stata espressa in accordo con i criteri descritti da Fabia e collaboratori (Fabia et al., 1992); come mostrato in tabella [Tabella 2] ad ogni parametro è stato attribuito un punteggio da 0

a 3 a seconda della gravità del danno: (0) nessuno, (1) lieve, (2) moderato, (3) severo.

Lo score finale è il risultato della somma degli score individuali.

<i>Variables</i>	<i>Severity of changes</i>			
	<i>0</i>	<i>1</i>	<i>2</i>	<i>3</i>
<i>Ulceration</i>	<i>No Ulcer</i>	<i>Erosions or single ulceration not exceeding lamina muscularis mucosae</i>	<i>Multifocal ulceration not exceeding the submucosa</i>	<i>Ulceration exceeding the submucosa</i>
<i>Mucosal Atrophy</i>	<i>Normal thickness</i>	<i>Mild atrophy (<10%)</i>	<i>Moderate atrophy (10-50%)</i>	<i>Severe atrophy (>50%)</i>
<i>Edema(submucosal)</i>	<i>Normal thickness</i>	<i>Mild edema (submucosal expansion, 10-100%)</i>	<i>Moderate edema (submucosal expansion, 10-100%)</i>	<i>Severe edema (submucosal expansion, >100%)</i>
<i>Inflammatory cell infiltration</i>	<i>No inflammatory cell infiltration</i>	<i>Mild inflammatory cell infiltration; few scattered cells</i>	<i>Moderate: distributed but not dense inflammatory cell infiltration</i>	<i>Dense inflammatory cell infiltration</i>
<i>Vascular dilatation</i>	<i>Normal blood vessels</i>	<i>Mild dilatation of single blood vessels</i>	<i>Moderate dilatation of several blood vessels</i>	<i>Severe dilatation of several blood vessels</i>

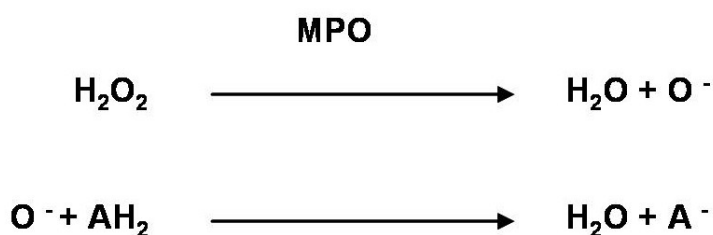
Tabella 2: Variabili considerate per la valutazione del danno istologico microscopico colonico. Adattato da Fabia et al., 1992; Digestion 53: 35-44

Saggio dell'attività mieloperossidasi (MPO)

L'attività dell'enzima MPO, presente nei granuli primari di cellule polimorfonucleate, è stata determinata in campioni di colon distale, secondo la tecnica descritta da Bradley (Bradley et al., 1982). Porzioni di colon di circa 1 cm sono state sospese in un tampone di fosfato di potassio (KH_2PO_4 44mM, K_2HPO_4 6 mM, pH 6.0), omogeneizzate in ghiaccio per mezzo di un omogenizzatore Polytron (PCU-2, Kinematica GmbH, Lucerna, Svizzera) e sottoposte a tre cicli di congelamento e scongelamento. Gli omogenati sono stati centrifugati a 9000g per 15 min a 4 °C. I precipitati sono stati nuovamente sospesi in un tampone di bromuro di

esadeciltrimetilammonio (hexadecyl trimetilammonio bromide; HTAB) (0.5% (peso/volume) in tampone di fosfato di potassio) per estrarre l'enzima MPO dai granuli primari dei neutrofili. Tali sospensioni sono state successivamente sonicate (Büchi, Flawil, Svizzera) in ghiaccio e centrifugate a 9000g per 15 min a 4 °C. Il supernatante è stato diluito in un tampone fosfato di potassio contenente 0.167 mg di diidrociloro o-dianisidina/ml (O-dianisidine diidrociloro; ODHC) e 0.00005% (vol/vol) H₂O₂.

MPO trasforma H₂O₂ in H₂O e radicale ossigeno (O⁻), composto altamente reattivo, capace di combinarsi con ODHC, donatore di idrogeno (AH₂), e di convertirlo in un composto colorato (A). L'intensità della colorazione misurata è proporzionale al contenuto tissutale di MPO.



Come standard di riferimento, è stato usato MPO derivante da neutrofili umani (Sigma, Saint Quentin Fallavier, Francia; 0.1 U/ml). Sono stati registrati con uno spettrofotometro le variazioni di assorbanza a 450 nm (mc2UV, Safas, Monaco) ogni 10s per 2 min. L'unità di attività MPO è stata definita come la quantità di enzima che degrada 1 µmol H₂O₂ min⁻¹ ml⁻¹ a 25 °C ed è stata espressa come rapporto di unità di MPO rispetto alle proteine totali (unità/g). Le concentrazioni proteiche totali di ogni campione (mg/ml) sono state determinate per mezzo di una variante del metodo Lowry (Saggio della Compatibilità del Detergente, BioRad, Ivry/Seine, Francia).

Valutazione dei livelli di citochine nella mucosa colonica

Le proteine tissutali sono state estratte con tampone RIPA (1% Igepal, 0.5% acido deossicolico e 0.1% di SDS in TRIS buffer 1x; PH 7.4) contenete un cocktail di inibitori di proteasi (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany). I lisati sono stati centrifugati a 10000g per 10 min, e la concentrazione proteica totale è stata determinata con BCA test (Interchim). I campioni sono stati saggiati con il test ELISA utilizzando kit per la determinazione di IL1- β e IL-10 (ELISA kits R&D Systems), secondo le indicazioni del fornitore. I dati sono stati espressi come concentrazione/mg di proteine.

Livelli plasmatici di N/OFQ

Campioni di sangue derivati dal gruppo di animali di controllo, TNBS+salina e TNBS + UFP-101 (1 - 3 - 10 nmol/Kg) sono stati raccolti in provette contenenti EDTA dipotassico (8mg) e Aprotinina (4 TIU/200 soluzione fisiologica), e immediatamente centrifugati a 1200g a 4° C per 10 minuti. L'estrazione del peptide dal plasma è avvenuta attraverso una cromatografia liquida su colonna; il campione di plasma è stato acidificato con 1 ml di acidotrifluoroacetico (TFA) (1%/ml) ed applicato ad una cartuccia Sep-Pak C18 (Waters, Milford, MA) precedentemente attivata con metanolo, acqua distillata e di TFA (1%). Il materiale assorbito dalla cartuccia è stato quindi lavato con TFA (0.1%), eluito con 2 ml di una soluzione contenete acetonitrile (70%), TFA (0.1%) e acqua distillata (29.9%) ed infine evaporato. Il recupero medio di N/OFQ marcata aggiunta al campione è stato del $75.5 \pm 1,3\%$.

I livelli di N/OFQ sono stati determinati impiegando un Kit RIA commerciale fornito dalla Bakem (Weil amRhein, Germany), seguendo le indicazioni del fornitore. Il metodo utilizza N/OFQ marcata con iodio, (I^{125}), un peptide freddo non radioattivo

(ovvero N/OFQ contenuta nel plasma), ed un anticorpo specifico per N/OFQ con il quale il peptide forma un complesso antigene-anticorpo. La tecnica si basa sulla competizione tra il peptide freddo e una quantità fissa del peptide marcato per il legame con un numero limitato di siti anticorpali presenti in una quantità costante di antisiero. La quantità di antigene marcato legata all'anticorpo diminuirà man mano che l'antigene freddo aumenta nel campione.

In dettaglio i campioni essiccati, dopo essere stati ricostituiti con il tampone fornito dal Kit, sono stati incubati con l'anticorpo primario per 24h a 4°C. E' stata quindi aggiunta una quantità nota di peptide marcato e dopo un nuovo periodo di incubazione di 24h a 4°C, durante il quale avviene la competizione tra il peptide freddo e il peptide marcato per il legame all'anticorpo, è stata aggiunta una sospensione di anticorpo secondario, allo scopo di far precipitare il complesso antigene-anticorpo. Le provette sono state poi centrifugate e una volta eliminato il sovranatante è stata contata la radioattività presente nel precipitato mediante un contatore di emissioni gamma. Le concentrazioni di N/OFQ plasmatiche sono state estrapolate da una curva standard utilizzando il sistema GraphPad Prism versione 4.0 (GraphPad, San Diego, CA).

Analisi statistica

Tutti i risultati, espressi come media \pm S.E.M. dei valori ottenuti in 8 ratti per ciascun gruppo, sono stati analizzati usando il sistema GraphPad Prism versione 4.0 (GraphPad, San Diego, CA). La significatività delle differenze tra i gruppi sperimentali è stata determinata con l'analisi della varianza ad una via (one way

ANOVA), seguita dal test di comparazione multipla di Dunnett's. Sono state considerate statisticamente significative le differenze con $P < 0.05$.

RISULTATI

Peso e consumo di cibo

Il peso degli animali e del cibo sono stati misurati sia il giorno dell'infusione del TNBS o della salina (D0) che il giorno del sacrificio (D4).

Come rappresentato in **Tabella 3**, quattro giorni dopo induzione di colite, sia il peso degli animali che il consumo di cibo si riducono significativamente negli animali trattati con TNBS + salina, rispetto ai controlli. Il trattamento farmacologico con N/OFQ o UFP-101 non modifica tale riduzione.

Danno macroscopico

Come atteso, l'induzione della colite determina la comparsa di un severo danno colonico, caratterizzato da iperemia, presenza di ulcere e aderenze tra il colon e altri organi intra-addominali. Nessuno dei trattamenti farmacologici, modifica il danno colonico macroscopico rispetto al gruppo TNBS + salina [**Tabella 4**].

Danno microscopico

L'induzione della colite provoca la comparsa di un danno colonico visibile anche a livello microscopico, caratterizzato dalla perdita dell'architettura della mucosa e dalla presenza di un massiccio infiltrato di cellule immunitarie che si estende attraverso la mucosa e la sottomucosa.

Iniezioni ripetute di basse dosi di N/OFQ (0.02 e 0.2 nmol/Kg), riducono il danno colonico indotto da TNBS, riportando gli score microscopici a livelli simili a quelli di animali di controllo. N/OFQ alla dose di 2 nmol/Kg non ha alcun effetto,

mentre la somministrazione ripetuta di un'alta dose di N/OFQ (20 nmol/Kg) aggrava il danno colonico infiammatorio indotto da TNBS [**Figura 8 A**].

La somministrazione ripetuta di UFP-101 alla dose di 1 nmol/Kg non modifica l'aumento degli score microscopici degli animali con colite. Sorprendentemente, UFP-101 alla dose di 3 e 10 nmol/Kg causa l'aggravamento del danno colonico microscopico indotto da TNBS [**Figura 8A**].

Esempi rappresentativi del danno istologico microscopico nel colon dei vari gruppi sperimentali sono riportati in **Figura 8B**.

In studi di antagonismo, l'effetto protettivo di N/OFQ (0.2 nmol/Kg) sul danno colonico da TNBS è completamente antagonizzato dal pretrattamento con UFP-101 (1nmol/Kg) [**Tabella 5**].

Attività mieloperossidasi (MPO)

Quattro giorni dopo l'infusione di TNBS, l'attività MPO colonica è significativamente aumentata rispetto al gruppo di controllo.

La somministrazione ripetuta di basse dosi di N/OFQ (0.02 e 0.2 nmol/Kg), riduce l'attività di MPO. N/OFQ alla dose di 2 nmol/Kg non ha alcun effetto, mentre la somministrazione ripetuta di un'alta dose di N/OFQ (20 nmol/Kg) aumenta l'attività enzimatica, rispetto agli animali con colite [**Figura 9A**].

La somministrazione ripetuta di UFP-101 alla dose di 1 nmol/Kg non ha alcun effetto sull'MPO, mentre UFP-101 alla dose di 3 e 10 nmol/Kg causa un aumento dell'attività di MPO colonica rispetto agli animali con colite [**Figura 9B**].

In studi di antagonismo il pretrattamento con UFP-101 (1nmol/Kg), antagonizza completamente l'effetto inibitorio di N/OFQ (0.2 nmol/Kg) sull'attività di MPO in ratti infusi con TNBS [Tabella 6].

Livelli di IL-1 β e IL-10 nella mucosa colonica

Come atteso, i livelli di IL-1 β nella mucosa colonica degli animali trattati con TNBS + salina aumentano rispetto ai ratti di controllo, mentre quelli di IL-10 diminuiscono [Figura 10A e 10B].

Iniezioni ripetute di basse dosi di N/OFQ (0.02 e 0.2 nmol/Kg), riducono l'incremento dei livelli della citochina pro-infiammatoria IL-1 β in ratti con colite. La somministrazione del peptide, alla dose di 20 nmol/Kg, e di UFP-101 alla dose di 10 nmol/Kg, non hanno alcun effetto [Figura 10A].

Nessuno dei trattamenti farmacologici, modifica il contenuto della citochina anti-infiammatoria IL-10, rispetto al gruppo TNBS + salina [Figura 10B].

Livelli plasmatici di N/OFQ

Quattro giorni dopo l'infusione di TNBS, i livelli plasmatici di N/OFQ non si modificano rispetto ai ratti di controllo. Iniezioni ripetute di UFP-101 alla dose di 1 nmol/Kg non hanno alcun effetto, mentre le somministrazioni di UFP-101 alla dose di 3 e 10 nmol/Kg riducono i livelli plasmatici di N/OFQ rispetto al gruppo TNBS + salina [Figura 11].

TRATTAMENTO		Δ (D 4-0) PESO (gr)	CONSUMO DEL CIBO (gr)
Controllo		49.3 \pm 1.5	119.8 \pm 2.3
TNBS +	Salina	- 6 \pm 1.4 ^a	58.6 \pm 9.7 ^a
	N/OFQ (0.02 nmol/Kg)	- 3.0 \pm 1.4 ^a	51.2 \pm 8.8 ^a
	N/OFQ (0.2 nmol/Kg)	- 7.2 \pm 3.1 ^a	60.80 \pm 17.1 ^a
	N/OFQ (2 nmol/Kg)	- 3.8 \pm 0.7 ^a	64.1 \pm 16.7 ^a
	N/OFQ (20 nmol/Kg)	- 5 \pm 3.1 ^a	43.2 \pm 5.3 ^a
	UFP-101 (1 nmol/Kg)	- 7.2 \pm 1.2 ^a	51.5 \pm 14.2
	UFP-101 (3 nmol/Kg)	- 5.8 \pm 2.1 ^a	44.2 \pm 7.8 ^a
	UFP-101 (10 nmol/Kg)	- 5.2 \pm 1.1 ^a	67.5 \pm 16.2 ^a

Tabella 3: Variazioni del peso e consumo di cibo degli animali, quattro giorni dopo l'infusione del TNBS o della salina, in differenti gruppi sperimentali. ^a $p < 0.0$ vs ratti controllo.

TRATTAMENTO		SCORE DANNO MACROSCOPICO
Controllo		0.0 \pm 0.0
TNBS +	Salina	7.5 \pm 0.7 ^a
	N/OFQ (0.02 nmol/Kg)	7.8 \pm 1.0 ^a
	N/OFQ (0.2 nmol/Kg)	8.1 \pm 0.6 ^a
	N/OFQ (2 nmol/Kg)	6.9 \pm 1.1 ^a
	N/OFQ (20 nmol/Kg)	7.8 \pm 1.1 ^a
	UFP-101 (1 nmol/Kg)	7.8 \pm 0.9 ^a
	UFP-101 (3 nmol/Kg)	7.9 \pm 0.7 ^a
	UFP-101 (10 nmol/Kg)	7.9 \pm 1.1 ^a

Tabella 4: Score del danno macroscopico nel colon, in differenti gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. ^a $p < 0.01$ vs ratti controllo.

TRATTAMENTO		SCORE DANNO MICROSCOPICO
Controllo		1.8 ± 0.36
TNBS +	Salina	5.0 ± 0.78 ^a
	N/OFQ (0.2 nmol/Kg)	2.0 ± 0.5 ^b
	UFP-101 (1 nmol/Kg)	4.75 ± 1.44
	UFP-101 + N/OFQ	5.1 ± 1.0

Tabella 5: Effetto del pretrattamento con UFP-101 (1 nmol/Kg) sulla riduzione del danno colonico microscopico indotto da N/OFQ (0.2 nmol/Kg) in ratti infusi con TNBS. I dati sono espressi come media ± SEM. ^a $p < 0.01$ vs ratti Controllo e ^b $p < 0.01$ vs ratti TNBS + salina.

TRATTAMENTO		ATTIVITA' MPO (U/g proteine)
Controllo		155.1 ± 14.79
TNBS +	Salina	589.9 ± 44.32 ^a
	N/OFQ (0.2 nmol/Kg)	261.10 ± 50.18 ^b
	UFP-101 (1 nmol/Kg)	588.5 ± 110.0
	UFP-101 + N/OFQ	634.61 ± 107.6

Tabella 6: Effetto del pretrattamento con UFP-101 (1 nmol/Kg) sulla riduzione dell'attività MPO colonica indotta da N/OFQ (0.2 nmol/Kg) in ratti infusi con TNBS. I dati sono espressi come media ± SEM. ^a $p < 0.01$ vs ratti Controllo e ^b $p < 0.01$ vs ratti TNBS + salina.

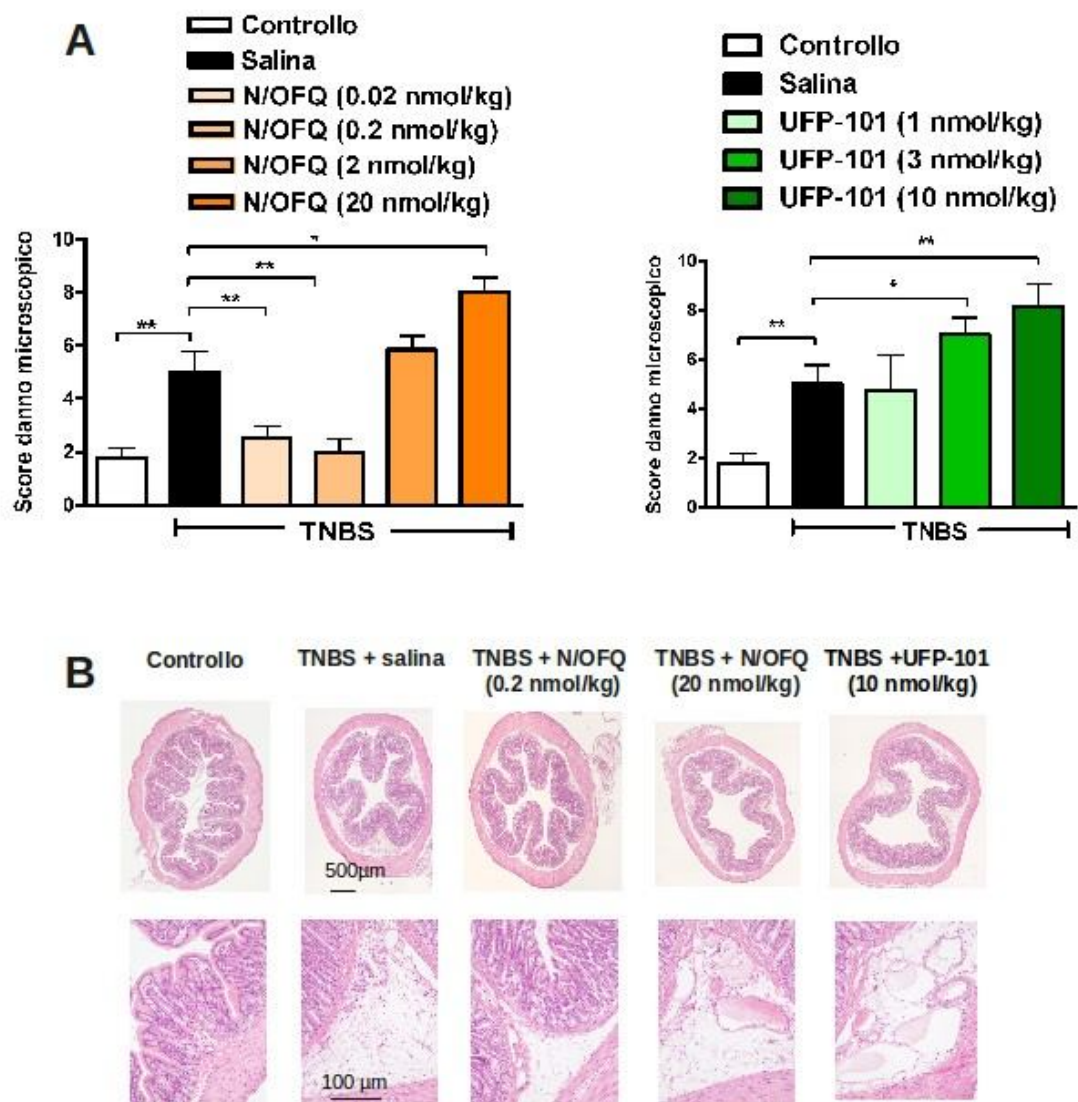


Figura 8: (A) Effetto di somministrazioni ripetute di N/OFQ (0.02 - 0.2 - 2 - 20 nmol/Kg) e di UFP-101 (1 - 3 - 10 nmol/Kg) sul danno colonico microscopico in ratti infusi con TNBS. (B) Esempi rappresentativi del danno istologico microscopico nel colon di ratti appartenenti a diversi gruppi sperimentali. I dati sono espressi come media \pm SEM. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs ratti TNBS + salina.

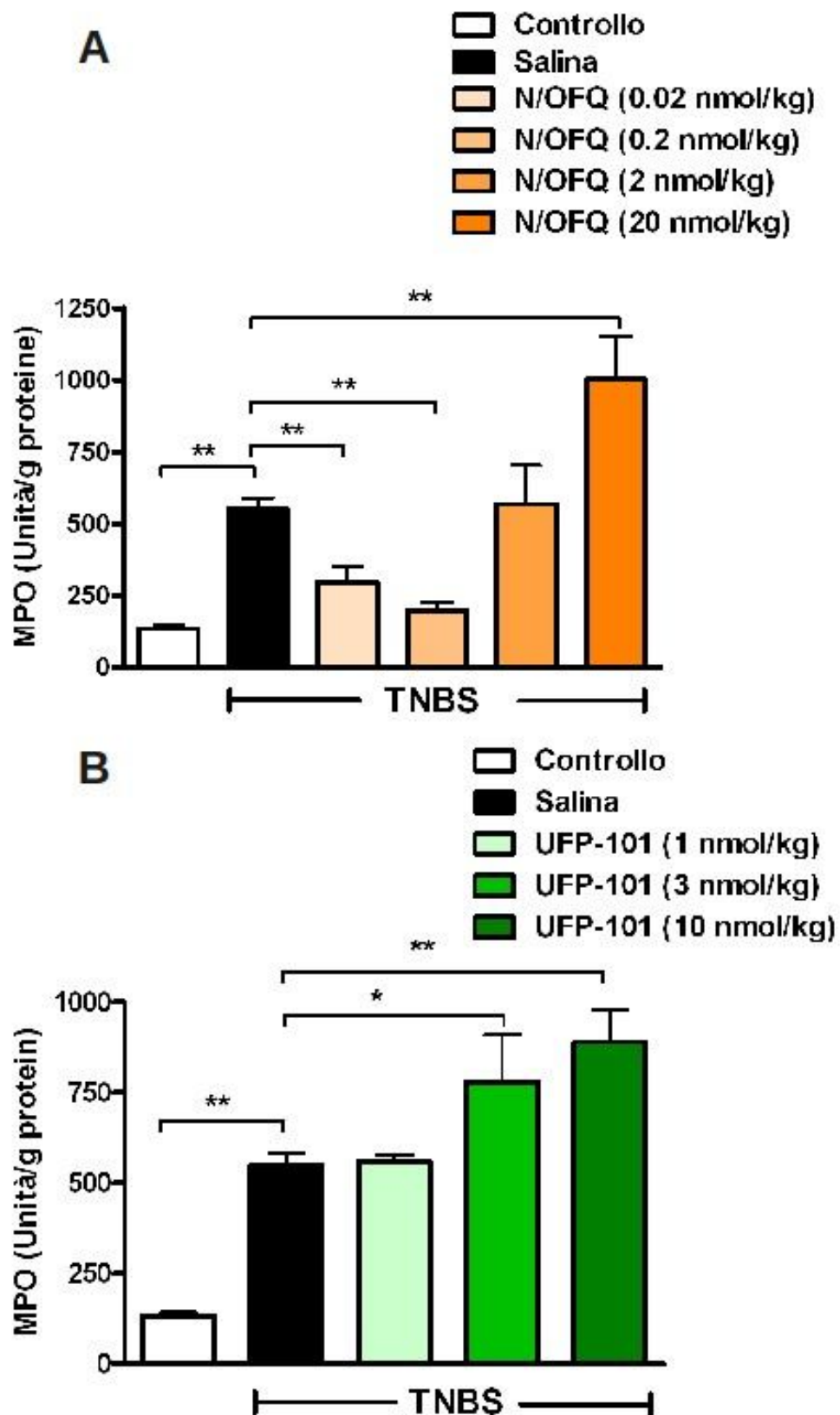


Figura 9: Effetto di somministrazioni ripetute di (A) N/OFQ (0.02 - 0.2 - 2 - 20 nmol/Kg) (B) e di UFP-101 (1 - 3 - 10 nmol/Kg) sull'attività MPO colonica, in ratti infusi con TNBS. I dati sono espressi come media \pm SEM. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs ratti TNBS + salina.

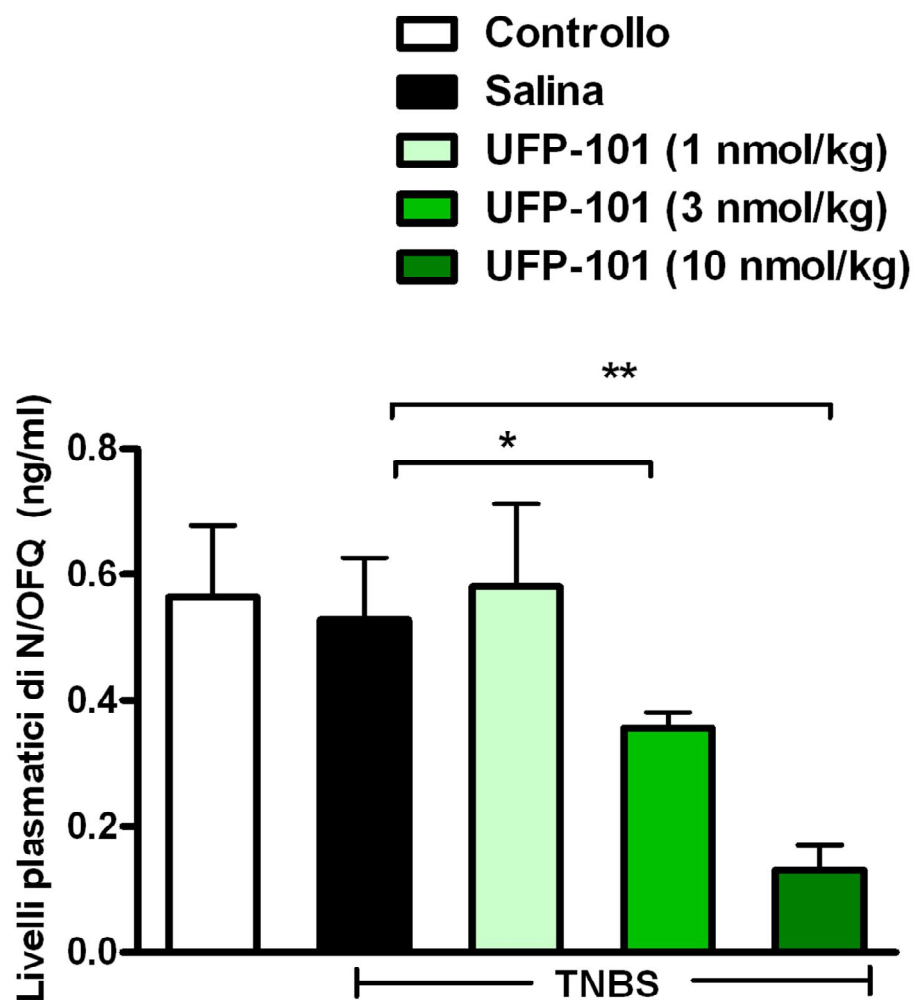


Figura 11: Livelli plasmatici di N/OFQ nel gruppo di animali di controllo, TNBS + salina, TNBS + UFP-101 (1 – 3 – 10 nmol/Kg). I dati sono espressi come media \pm SEM. * $p < 0.05$ e ** $p < 0.01$ vs ratti TNBS + salina.

DISCUSSIONE

I risultati di questo studio hanno, in primo luogo, messo in evidenza che la ripetuta somministrazione periferica di basse dosi di N/OFQ ha un effetto protettivo sulla colite indotta da instillazione di TNBS nel ratto. Il pretrattamento con l'antagonista selettivo per i recettori NOP, UFP-101, ad una dose priva di attività intrinseca, antagonizza completamente l'effetto protettivo osservato in questo modello sperimentale di colite, indicando che l'azione anti-infiammatoria di N/OFQ, è mediata dall'attivazione di recettori NOP periferici. Inoltre, dal momento che UFP-101, somministrato ad alte dosi, induce un effetto pro-infiammatorio e una riduzione dei livelli plasmatici di N/OFQ, è possibile ipotizzare che il sistema endogeno N/OFQergico periferico giochi un ruolo protettivo nell'infiammazione durante colite da TNBS nelle nostre condizioni sperimentali.

L'azione protettiva di N/OFQ a livello colonico è messa in evidenza dalla capacità del peptide di ridurre in animali con colite, l'attività della mieloperossidasi, enzima costitutivo dei neutrofili polimorfonucleati, la cui attività rappresenta un importante indice di infiammazione. L'effetto anti-infiammatorio è anche avvalorato dai risultati istologici: infatti, l'analisi degli score microscopici mostra che la somministrazione di basse dosi di N/OFQ riduce significativamente sia le modifiche dell'architettura che l'infiltrazione di cellule immunitarie a livello di mucosa e sottomucosa causate dalla colite.

L'effetto protettivo di basse dosi di N/OFQ sul danno indotto da TNBS non è stato, invece, osservato a livello macroscopico (iperemia, formazione di ulcere), e neppure nel recupero del peso corporeo e del consumo di cibo, parametri entrambi

ridotti negli animali con colite. Non è facile spiegare questa mancanza di corrispondenza tra risultati ottenuti a livello micro e macroscopico. Tale discrepanza potrebbe dipendere dal tipo di protocollo sperimentale impiegato: dose di TNBS, gravità di colite, durata del trattamento farmacologico. La dose di TNBS impiegata nello studio (60 mg/kg) causa una colite severa, che verosimilmente richiede tempi lunghi per il recupero. Inoltre, tutti i risultati riportati sono stati rilevati dopo 4 giorni dall'induzione di colite (momento che corrisponde al picco massimo dello stato di infiammazione), e dall'inizio del trattamento con N/OFQ. Non si può, pertanto, escludere che una colite meno grave indotta con dosi di TNBS minori e/o il prolungamento del periodo di trattamento farmacologico con N/OFQ possano favorire la scomparsa anche delle modifiche a livello macroscopico più resistenti al processo di guarigione.

L'azione protettiva di N/OFQ osservata nella colite da TNBS si accompagna inoltre alla riduzione dei livelli di IL-1 β , citochina pro-infiammatoria che svolge un ruolo chiave nel processo immunitario e i cui livelli solitamente aumentano proprio nelle IBD, specialmente nei pazienti affetti da morbo di Crohn. Il trattamento con N/OFQ non modifica invece i livelli della citochina anti-infiammatoria IL-10.

La capacità di N/OFQ di modificare i livelli di IL-1 β è ampiamente riportata in letteratura, tuttavia i nostri dati non chiariscono se tale modulazione sia la conseguenza di un'azione diretta o indiretta di N/OFQ sul sistema immunitario.

L'ipotesi di un'azione diretta del peptide è supportata dal fatto che i recettori NOP sono abbondantemente espressi sulla superficie di cellule immunitarie e mediano azioni immunosoppressive (Serhan et al., 2001). E' stato dimostrato che N/OFQ

riduce l'infiammazione attraverso la soppressione di citochine pro-infiammatorie in splenociti di ratto e in cellule T umane, e riduce l'espressione di mRNA per IL-1 β e di altre citochine in astrociti attivati da stimoli infiammatori (Waits et al., 2004; Miller et al., 2007; Fu et al., 2007). In linea con l'azione antiinfiammatoria diretta di basse dosi del peptide, studi di binding riportano che N/OFQ possiede un'elevata affinità di legame con i recettori NOP localizzati su cellule immunitarie (Anton et al., 2010).

Non possiamo comunque escludere che gli effetti da noi osservati possano anche essere la conseguenza di un'interazione di N/OFQ con altri sistemi endogeni di regolazione, e quindi dipendere da un'azione indiretta del peptide. E' ampiamente accettato che gli stimoli infiammatori sono degli "stressogeni" capaci di indurre segnali CRF-dipendenti in diversi tessuti, promuovendo risposta immunitaria. In particolare, a livello intestinale l'attivazione di vie CRF₁-dipendenti induce effetti pro-infiammatori in modelli di colite nel ratto, ed in particolare proprio in quello da instillazione di TNBS (Kiank et al., 2010; Asadi et al., 2012). Dal momento che N/OFQ si è rivelata essere, in altre condizioni sperimentali, antagonista funzionale dei recettori CRF₁, è possibile che l'azione anti-infiammatoria del peptide da noi osservata, sia dovuta all'inibizione di vie che coinvolgono l'attivazione di recettori CRF₁ (Broccardo et al., 2008; Rodi et al., 2008).

I risultati del nostro lavoro hanno, inoltre, evidenziato che la ripetuta somministrazione periferica di alte dosi di N/OFQ durante colite da TNBS aggrava i parametri infiammatori studiati (attività MPO e danno colonico microscopico), senza tuttavia modificare il contenuto colonico delle citochine da noi analizzate (IL-1 β e IL-10).

Quale possa essere il preciso meccanismo degli opposti effetti, anti- e pro-infiammatori, indotti dalla somministrazione, rispettivamente di basse e di alte dosi di N/OFQ, al momento non è chiaro, e richiederà senza dubbio ulteriori approfondimenti. Possiamo, tuttavia, affermare che l'effetto aggravante sulla colite non può essere sicuramente associato alla ben nota attività antipropulsiva del peptide e, quindi, al ristagno del contenuto intestinale di TNBS, poiché essa è presente anche alle dosi di N/OFQ inferiori e comparabili con quelle che, nel nostro studio, hanno mostrato possedere proprietà anti-infiammatorie (Broccardo et al., 2008).

Recenti studi sul ratto mostrano che alte dosi di N/OFQ, corrispondenti a quelle utilizzate nel nostro lavoro, inducono, in ratti sani, un effetto pro-infiammatorio associabile ad un aumento della vasodilatazione del microcircolo mesenterico, ad una riduzione della velocità del flusso ematico, ad un aumento del rolling, dell'adesione leucocitaria, e dell'espressione di $\beta 2$ integrina (CD18/CD11b) sulla superficie di neutrofili circolanti (Brookes et al., 2007). È dunque possibile che gli effetti aggravanti, da noi osservati, sul danno infiammatorio indotto da TNBS, siano il risultato di un'interazione con vie che controllano il tono della muscolatura liscia vasale, la permeabilità vascolare e la chemiotassi. In questo senso, perciò, è probabile che differenti meccanismi siano alla base della duplice azione, protettiva ed aggravante, di N/OFQ nella colite sperimentale da TNBS.

Un altro dato interessante riportato in questo studio, è che la ripetuta somministrazione di alte dosi dell'antagonista NOP, UFP-101, durante colite, ha un effetto aggravante su alcuni parametri infiammatori studiati, che mette in luce il ruolo protettivo del sistema N/OFQergico endogeno periferico in questa condizione

patologica. È interessante notare che nel ratto, nelle stesse condizioni sperimentali, il trattamento con UFP-101 causa un aumento dell'ipersensibilità viscerale in ratti con colite sottoposti a distensione colonica (Agostini et al., 2009), che rivela il ruolo protettivo che il sistema N/OFQergico endogeno periferico ha durante la colite anche nella percezione del dolore.

Il coinvolgimento del sistema endogeno N/OFQergico nella colite sperimentale è riportato anche in alcuni studi nel topo (Kato et al., 2005; Alt et al., 2012). In particolare, in topi knockout per il recettore NOP ed in topi trattati con un antagonista dei recettori NOP (SB612111) durante colite indotta da DSS, è stato messo in evidenza il ruolo aggravante del sistema N/OFQergico (Kato et al., 2005; Alt et al., 2012).

Tale ruolo aggravante del sistema NOP riportato nel topo può corrispondere all'effetto pro infiammatorio del peptide da noi evidenziato nel ratto in seguito al trattamento con dosi alte di N/OFQ, ma mal si collega all'effetto protettivo di dosi basse di N/OFQ e a quello aggravante dell'antagonista UFP 101 da noi osservati nel ratto, che insieme indicherebbero un ruolo protettivo del sistema. Per quanto riguarda tale discrepanza, non è la prima volta che il sistema N/OFQergico media effetti opposti nel topo e nel ratto (ansigeno/ansiolitico; aumento/riduzione attività locomotoria; inibizione/stimolazione di HPA) (Devine et al., 1996; Jenck et al., 1997; Devine et al., 2001; Le Cudennec et al., 2002; Fernandez et al., 2004; Gavioli et al., 2007). E' difficile spiegare perché N/OFQ eserciti ruoli opposti in specie animali differenti. Ancora più difficile dare spiegazioni dal momento che esistono, oltre alle differenze di specie, complesse differenze nei modelli sperimentali: impiego di "ratti

wild type per il recettore NOP” da un lato, e “topi knockout per il recettore NOP” dall’altro, che risultano senza dubbio di difficile comparazione.

Resta a questo punto anche da spiegare perché, l’antagonista NOP nel topo riduca l’infiammazione e nel ratto la aumenti. I due antagonisti impiegati nel topo e nel ratto, comunque, sono differenti. Infatti, è noto che UFP-101, l’antagonista utilizzato nel nostro studio, nel ratto, non è in grado di attraversare la barriera emato-encefalica (BEE) e blocca quindi soltanto i recettori NOP periferici (Calò et al., 2005); al contrario SB612111, antagonista non peptidico dei recettori NOP, utilizzato nello studio di Alt e collaboratori nel topo, è in grado di superare la BEE, e di bloccare quindi anche i recettori NOP centrali (Alt et al., 2012). Non si può escludere, pertanto, l’ipotesi che gli effetti opposti osservati, protettivi nel ratto ed aggravanti nel topo, risultino, in realtà, opposti perché mediati da siti distinti, periferici (protettivi) e centrali (aggravanti). A questo riguardo, numerosi dati di letteratura riportano che N/OFQ attivando siti centrali e periferici è capace di indurre effetti opposti (Zeilhofer et al., 2003).

D’altra parte non possiamo sottovalutare il fatto che il modello di colite da noi usato nel ratto, TNBS, e quello usato nel topo, DSS, abbiano meccanismi eziopatogenetici molto diversi, anche se con caratteristiche comuni. Nel modello di colite da TNBS, che riproduce nel ratto il morbo di Crohn umano, l’instillazione intrarettale di TNBS (un aptene) è in grado di attivare una risposta infiammatoria attraverso l’attivazione di cellule T (te Velde et al., 2006). Nel modello di colite da DSS, che riproduce la Colite Ulcerosa umana, l’assunzione del DSS attraverso l’acqua da bere, danneggia la mucosa colonica, causando difetti nell’integrità della barriera

epiteliale e della permeabilità colonica e un aumento di lesioni displastiche (Perse et al., 2012).

Nel tentativo di approfondire ulteriormente lo studio del ruolo endogeno del sistema N/OFQergico nella colite, abbiamo anche determinato i livelli plasmatici di N/OFQ in ratti sani di controllo, in ratti con colite e in ratti con colite trattati con UFP-101.

I risultati ottenuti nel nostro studio, confermano la presenza di N/OFQ nel plasma di ratto in condizioni fisiologiche (Joseph et al., 2007) e mostrano, per la prima volta, che i livelli del peptide non si modificano in seguito a colite da TNBS nel ratto. La somministrazione ripetuta di UFP-101, alle dosi che inducono aggravamento del danno da TNBS, si è sorprendentemente rivelata capace di ridurre i livelli plasmatici di N/OFQ rispetto al gruppo di controllo e ai ratti trattati con il TNBS. Questa riduzione, probabilmente dovuta ad un aumento della degradazione o ad una riduzione della sintesi e/o rilascio di N/OFQ, che si accompagna all'aggravamento del danno colonico indotto da UFP-101 già osservato, rappresenta una ulteriore conferma del ruolo protettivo del sistema N/OFQergico endogeno periferico nella colite da TNBS, nel ratto, precedentemente descritto.

Ad oggi non vi sono dati di letteratura che correlino i livelli plasmatici di N/OFQ con le IBD umane, mentre esistono numerosi studi che hanno misurato i livelli plasmatici del peptide in presenza di altre patologie. (Anderberg et al., 1998; Brooks et al., 1998; Ko et al., 2002; Ertsey et al., 2004; Fontana et al., 2009; Krepuska et al., 2011). Sarà dunque interessante, in un prossimo futuro misurare i livelli plasmatici del peptide in pazienti affetti da morbo di Crohn in diversi stadi della malattia.

Riassumendo, i risultati ottenuti in *vivo* sul ratto, in un modello sperimentale di infiammazione intestinale, dimostrano che:

- 1. la somministrazione ripetuta di N/OFQ per via periferica ha una duplice azione anti-e pro-infiammatoria, strettamente dipendente dalla dose impiegata;**
- 2. gli effetti protettivi osservati sono mediati dall'attivazione di recettori NOP periferici;**
- 3. il sistema N/OFQergico endogeno svolge un ruolo protettivo nella modulazione dell'infiammazione.**

Queste osservazioni insieme alle già note capacità di N/OFQ di ridurre la motilità colonica in condizioni di alterata funzionalità gastrointestinale (Broccardo et al., 2008) e di attenuare il dolore viscerale in un modello animale che riproduce le IBD umane (Agostini et al., 2009), mettono in evidenza un ruolo modulatorio del sistema N/OFQergico in alcune condizioni infiammatorie dell'intestino, caratterizzate da dismotilità, dolore viscerale e lesioni della mucosa. Su questa base si apre la strada ad ulteriori ricerche che consentiranno di approfondire le conoscenze sugli effetti del sistema N/OFQergico in presenza di patologie infiammatorie intestinali e di aggiungere un nuovo target terapeutico nella sempre più crescente lista dei potenziali rimedi in queste patologie.

BIBLIOGRAFIA

- Abdelrahman AM, Pang CC. Effect of nociceptin/orphanin FQ on venous tone in conscious rats. *Eur J Pharmacol.* 2002 Nov 29;455(2-3):143-7.
- Agostini S, Eutamene H, Broccardo M, Improta G, Petrella C, Theodorou V, Bueno L. Peripheral anti-nociceptive effect of nociceptin/orphanin FQ in inflammation and stress-induced colonic hyperalgesia in rats. *Pain.* 2009 Feb;141(3):292-9.
- Ahmad T, Satsangi J, McGovern D, Bunce M, Jewell DP. Review article: the genetics of inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 2001 Jun;15(6):731-48.
- Ahmad T, Tamboli CP, Jewell D, Colombel JF. Clinical relevance of advances in genetics and pharmacogenetics of IBD. *Gastroenterology.* 2004 May;126(6):1533-49.
- Ahmadi S, Kotalla C, Gühring H, Takeshima H, Pahl A, Zeilhofer HU. Modulation of synaptic transmission by nociceptin/orphanin FQ and nocistatin in the spinal cord dorsal horn of mutant mice lacking the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Mol Pharmacol.* 2001 Mar;59(3):612-8.
- Allen RG, Peng B, Pellegrino MJ, Miller ED, Grandy DK, Lundblad JR, Washburn CL, Pintar JE. Altered processing of pro-orphanin FQ/nociceptin and pro-opiomelanocortin-derived peptides in the brains of mice expressing defective prohormone convertase 2. *J Neurosci.* 2001 Aug 15;21(16):5864-70.
- Alt C, Lam JS, Harrison MT, Kershaw KM, Samuelsson S, Toll L, D'Andrea A. Nociceptin/orphanin FQ inhibition with SB612111 ameliorates dextran sodium sulfate-induced colitis. *Eur J Pharmacol.* 2012 May 15;683(1-3):285-93.
- Ambriz-Tututi M, Rocha-González HI, Castañeda-Corral G, Araiza-Saldaña CI, Caram-Salas NL, Cruz SL, Granados-Soto V. Role of opioid receptors in the reduction of formalin-induced secondary allodynia and hyperalgesia in rats. *Eur J Pharmacol.* 2009 Oct 1;619(1-3):25-32.
- Amodeo P, Guerrini R, Picone D, Salvadori S, Spadaccini R, Tancredi T, Temessi PA. Solution structure of nociceptin peptides. *J Pept Sci.* 2002 Sep;8(9):497-509.
- Amodeo P, López Méndez B, Guerrini R, Salvadori S, Temussi PA, Tancredi T. Pain peptides. Solution structure of orphanin FQ2. *FEBS Lett.* 2000 May 12;473(2):157-60.
- Anderberg UM, Liu Z, Berglund L, Nyberg F. Plasma levels on nociceptin in female fibromyalgia syndrome patients. *Z Rheumatol.* 1998;57 Suppl 2:77-80.
- Anton B, Leff P, Meissler JJ, Calva JC, Acevedo R, Salazar A, Matus M, Flores A, Martinez M, Adler MW, Gaughan JP, Eisenstein TK. Nociceptin/orphanin FQ suppresses adaptive immune responses in vivo and at picomolar levels in vitro. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010 Mar;5(1):143-54.
- Appleyard CB, Wallace JL. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. *Am J Physiol.* 1995 Jul;269(1 Pt 1):G119-25.
- Arjomand J, Cole S, Evans CJ. Novel orphanin FQ/nociceptin transcripts are expressed in human immune cells. *J Neuroimmunol.* 2002 Sep;130(1-2):100-8.
- Asadi S, Alysandratos KD, Angelidou A, Miniati A, Sismanopoulos N, Vasiadi M, Zhang B, Kalogeromitros D, Theoharides TC. Substance P (SP) induces

- expression of functional corticotropin-releasing hormone receptor-1 (CRHR-1) in human mast cells. *J Invest Dermatol.* 2012 Feb;132(2):324-9. doi: 10.1038/jid.2011.334.
- Bonfils S. "Restraint ulcer" as a model of stress-induced gastric lesion. A historical note. *Ann N Y Acad Sci.* 1993 Oct 29;697:229-32.
- Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982 Mar;78(3):206-9.
- Broccardo M, Agostini S, Petrella C, Guerrini R, Improta G. Central and peripheral role of the nociceptin/orphaninFQ system on normal and disturbed colonic motor function and faecal pellet output in the rat. *Neurogastroenterol Motil.* 2008 Aug;20(8):939-48.
- Broccardo M, Guerrini R, Morini G, Polidori C, Agostini S, Petrella C, Improta G. The gastric effects of UFP-112, a new nociceptin/orphanin receptor agonist, in physiological and pathological conditions. *Peptides.* 2007 Oct;28(10):1974-81..
- Broccardo M, Guerrini R, Petrella C, Improta G. Gastrointestinal effects of intracerebroventricularly injected nociceptin/orphaninFQ in rats. *Peptides.* 2004 Jun;25(6):1013-20.
- Broccardo M, Scaccianoce S, Del Bianco P, Agostini S, Petrella C, Improta G. Nociceptin/orphanin FQ-induced delay in gastric emptying: role of central corticotropin-releasing factor and glucocorticoid receptors. *Neurogastroenterol Motil.* 2005 Dec;17(6):871-7.
- Brookes ZL, Stedman EN, Guerrini R, Lawton BK, Calo G, Lambert DG. Proinflammatory and vasodilator effects of nociceptin/orphanin FQ in the rat mesenteric microcirculation are mediated by histamine. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 Nov;293(5):H2977-85.
- Brooks H, Elton CD, Smart D, Rowbotham DJ, McKnight AT, Lambert DG. Identification of nociceptin in human cerebrospinal fluid: comparison of levels in pain and non-pain states. *Pain.* 1998 Oct;78(1):71-3.
- Burmeister MA, Ansonoff MA, Pintar JE, Kapusta DR. Nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ)-evoked bradycardia, hypotension, and diuresis are absent in N/OFQ peptide (NOP) receptor knockout mice. *J Pharmacol Exp Ther.* 2008 Sep;326(3):897-904.
- Burmeister MA, Kapusta DR. Centrally administered nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) evokes bradycardia, hypotension, and diuresis in mice via activation of central N/OFQ peptide receptors. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jul;322(1):324-31.
- Butour JL, Moisand C, Mazarguil H, Mollereau C, Meunier JC. Recognition and activation of the opioid receptor-like ORL 1 receptor by nociceptin, nociceptin analogs and opioids. *Eur J Pharmacol.* 1997 Feb 19;321(1):97-103.
- Calo G, Guerrini R, Rizzi A, Salvadori S, Burmeister M, Kapusta DR, Lambert DG, Regoli D. UFP-101, a peptide antagonist selective for the nociceptin/orphanin FQ receptor. *CNS Drug Rev.* 2005 Summer;11(2):97-112.
- Calo G, Rizzi A, Rizzi D, Bigoni R, Guerrini R, Marzola G, Marti M, McDonald J, Morari M, Lambert DG, Salvadori S, Regoli D. [Nphe1,Arg14,Lys15]nociceptin-

- NH2, a novel potent and selective antagonist of the nociceptin/orphanin FQ receptor. *Br J Pharmacol.* 2002 May;136(2):303-11.
- Calò G, Rizzi A, Bodin M, Neugebauer W, Salvadori S, Guerrini R, Bianchi C, Regoli D. Pharmacological characterization of nociceptin receptor: an in vitro study.
- Calò G, Rizzi A, Marzola G, Guerrini R, Salvadori S, Beani L, Regoli D, Bianchi C. Pharmacological characterization of the nociceptin receptor mediating hyperalgesia in the mouse tail withdrawal assay. *Br J Pharmacol.* 1998 Sep;125(2):373-8.
- Camoglio L, te Velde AA, de Boer A, ten Kate FJ, Kopf M, van Deventer SJ. Hapten-induced colitis associated with maintained Th1 and inflammatory responses in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol.* 2000 May;30(5):1486-95.
- Carvalho D, Petronilho F, Vuolo F, Machado RA, Constantino L, Guerrini R, Calo G, Gavioli EC, Streck EL, Dal-Pizzol F. The nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor antagonist effects on an animal model of sepsis. *Intensive Care Med.* 2008 Dec;34(12):2284-90.
- Chen Y, Fan Y, Liu J, Mestek A, Tian M, Kozak CA, Yu L. Molecular cloning, tissue distribution and chromosomal localization of a novel member of the opioid receptor gene family. *FEBS Lett.* 1994 Jun 27;347(2-3):279-83.
- Chen YL, Li AH, Yeh TH, Chou AH, Wang HL. Nocistatin and nociceptin exert opposite effects on the excitability of central amygdala nucleus-periaqueductal gray projection neurons. *Mol Cell Neurosci.* 2009 Jan;40(1):76-88.
- Chiou LC, Liao YY, Fan PC, Kuo PH, Wang CH, Riemer C, Prinssen EP. Nociceptin/orphanin FQ peptide receptors: pharmacology and clinical implications. *Curr Drug Targets.* 2007 Jan;8(1):117-35..
- Ciccocioppo R, Economidou D, Fedeli A, Angeletti S, Weiss F, Heilig M, Massi M. Attenuation of ethanol self-administration and of conditioned reinstatement of alcohol-seeking behaviour by the antiopioid peptide nociceptin/orphanin FQ in alcohol-preferring rats. *Psychopharmacology (Berl).* 2004 Mar;172(2):170-8.
- Cominelli F, Nast CC, Clark BD, Schindler R, Lierena R, Eysselein VE, Thompson RC, Dinarello CA. Interleukin 1 (IL-1) gene expression, synthesis, and effect of specific IL-1 receptor blockade in rabbit immune complex colitis. *J Clin Invest.* 1990 Sep;86(3):972-80.
- Connor M, Yeo A, Henderson G. The effect of nociceptin on Ca²⁺ channel current and intracellular Ca²⁺ in the SH-SY5Y human neuroblastoma cell line. *Br J Pharmacol.* 1996 May;118(2):205-7.
- Connor M, Vaughan CW, Chieng B, Christie MJ. Nociceptin receptor coupling to a potassium conductance in rat locus coeruleus neurones in vitro. *Br J Pharmacol.* 1996 Dec;119(8):1614-8.
- Cosnes J. Tobacco and IBD: relevance in the understanding of disease mechanisms and clinical practice. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2004 Jun;18(3):481-96.
- Cosnes J, Gower-Rousseau C, Seksik P, Cortot A. Epidemiology and natural history of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* 2011 May;140(6):1785-94.
- Courteix C, Coudoré-Civiale MA, Privat AM, Pélissier T, Eschalier A, Fialip J. Evidence for an exclusive antinociceptive effect of nociceptin/orphanin FQ, an

- endogenous ligand for the ORL1 receptor, in two animal models of neuropathic pain. *Pain*. 2004 Jul;110(1-2):236-45.
- Cox BM, Chavkin C, Christie MJ, et al. Opioid receptors. In : Girdlestone D, editor. *The IUPHAR Compendium of Receptor Characterization and Classification*. London: IUPHAR Media Ltd; 2000. p. 321-33.
- Currò D, Yoo JH, Anderson M, Song I, Del Valle J, Owyang C. Molecular cloning of the orphanin FQ receptor gene and differential tissue expression of splice variants in rat. *Gene*. 2001 Mar 21;266(1-2):139-45.
- Darlison MG, Greten FR, Harvey RJ, Kreienkamp HJ, Stühmer T, Zwiers H, Lederis K, Richter D. Opioid receptors from a lower vertebrate (*Catostomus commersoni*): sequence, pharmacology, coupling to a G-protein-gated inward-rectifying potassium channel (GIRK1), and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jul 22;94(15):8214-9.
- Devine DP, Taylor L, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr, Civelli O, Akil H. Rats rapidly develop tolerance to the locomotor-inhibiting effects of the novel neuropeptide orphanin FQ. *Neurochem Res*. 1996 Nov;21(11):1387-96.
- Devine DP, Watson SJ, Akil H. Nociceptin/orphanin FQ regulates neuroendocrine function of the limbic-hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroscience*. 2001;102(3):541-53.
- Di Giannuario A, Pieretti S, Catalani A, Loizzo A. Orphanin FQ reduces morphine-induced dopamine release in the nucleus accumbens: a microdialysis study in rats. *Neurosci Lett*. 1999 Sep 17;272(3):183-6.
- Dooley CT, Houghten RA. Orphanin FQ: receptor binding and analog structure activity relationships in rat brain. *Life Sci*. 1996;59(1):PL23-9.
- Dooley CT, Spaeth CG, Berzetei-Gurske IP, Craymer K, Adapa ID, Brandt SR, Houghten RA, Toll L. Binding and in vitro activities of peptides with high affinity for the nociceptin/orphanin FQ receptor, ORL1. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Nov;283(2):735-41.
- Economidou D, Fedeli A, Fardon RM, Weiss F, Massi M, Ciccocioppo R. Effect of novel nociceptin/orphanin FQ-NOP receptor ligands on ethanol drinking in alcohol-preferring msP rats. *Peptides*. 2006 Dec;27(12):3299-306.
- Ertsey C, Hantos M, Bozsik G, Tekes K. Circulating nociceptin levels during the cluster headache period. *Cephalalgia*. 2004 Apr;24(4):280-3.
- Fabia R, Ar'Rajab A, Willén R, Andersson R, Åhrén B, Larsson K, Bengmark S. Effects of phosphatidylcholine and phosphatidylinositol on acetic-acid-induced colitis in the rat. *Digestion*. 1992;53(1-2):35-44.
- Fernandez F, Misilmeri MA, Felger JC, Devine DP. Nociceptin/orphanin FQ increases anxiety-related behavior and circulating levels of corticosterone during neophobic tests of anxiety. *Neuropsychopharmacology*. 2004 Jan;29(1):59-71.
- Filippetti R, Kloting I, Massi M, Cifani C, Polidori C. Involvement of cocaine-amphetamine regulated transcript in the differential feeding responses to nociceptin/orphanin FQ in dark agouti and Wistar Ottawa Karlsburg W rats. *Peptides*. 2007 Oct;28(10):1966-73.

- Fischetti C, Rizzi A, Gavioli EC, Marzola G, Trapella C, Guerrini R, Petersen JS, Calo G. Further studies on the pharmacological features of the nociceptin/orphanin FQ receptor ligand ZP120. *Peptides*. 2009 Feb;30(2):248-55.
- Fiset ME, Gilbert C, Poubelle PE, Pouliot M. Human neutrophils as a source of nociceptin: a novel link between pain and inflammation. *Biochemistry*. 2003 Sep 9;42(35):10498-505.
- Flores CA, Shughrue P, Petersen SL, Mokha SS. Sex-related differences in the distribution of opioid receptor-like 1 receptor mRNA and colocalization with estrogen receptor mRNA in neurons of the spinal trigeminal nucleus caudalis in the rat. *Neuroscience*. 2003;118(3):769-78.
- Fontana F, Bernardi P, Pizzi C, Spampinato S, Bedini A, Pich EM. Plasma nociceptin/orphanin FQ levels rise after spontaneous episodes of angina, but not during induced myocardial ischemia. *Peptides*. 2009 Sep;30(9):1705-9.
- Fu X, Zhu ZH, Wang YQ, Wu GC. Regulation of proinflammatory cytokines gene expression by nociceptin/orphanin FQ in the spinal cord and the cultured astrocytes. *Neuroscience*. 2007 Jan 5;144(1):275-85.
- Fukuda K, Kato S, Mori K, Nishi M, Takeshima H, Iwabe N, Miyata T, Houtani T, Sugimoto T. cDNA cloning and regional distribution of a novel member of the opioid receptor family. *FEBS Lett*. 1994 Apr 18;343(1):42-6.
- Gálvez J, Garrido M, Rodríguez-Cabezas ME, Ramis I, de Medina FS, Merlos M, Zarzuelo A. The intestinal anti-inflammatory activity of UR-12746S on reactivated experimental colitis is mediated through downregulation of cytokine production. *Inflamm Bowel Dis*. 2003 Nov;9(6):363-71.
- Gavioli EC, Duarte FS, Guerrini R, Calo G, Rae GA, M De Lima TC. GABA(A) signalling is involved in N/OFQ anxiolytic-like effects but not in nocistatin anxiogenic-like action as evaluated in the mouse elevated plus maze. *Peptides*. 2008 Aug;29(8):1404-12.
- Gavioli EC, Rizzi A, Marzola G, Zucchini S, Regoli D, Calo' G. Altered anxiety-related behavior in nociceptin/orphanin FQ receptor gene knockout mice. *Peptides*. 2007 Jun;28(6):1229-39.
- Giuliani S, Tramontana M, Lecci A, Maggi CA. Effect of nociceptin on heart rate and blood pressure in anaesthetized rats. *Eur J Pharmacol*. 1997 Aug 27;333(2-3):177-9.
- Grandi D, Solenghi E, Guerrini R, Broccardo M, Agostini S, Petrella C, Scaccianoce S, Improta G, Morini G. The hypothalamus-pituitary-adrenal axis does not influence the protective effects of nociceptin/orphanin FQ on the rat gastric mucosa. *Regul Pept*. 2009 Apr 10;154(1-3):32-8.
- Grandi D, Solenghi E, Guerrini R, Polidori C, Massi M, Morini G. Nociceptin/orphanin FQ prevents gastric damage induced by cold-restraint stress in the rat by acting in the periphery. *Peptides*. 2007 Aug;28(8):1572-9.
- Gué M, Del Rio-Lacheze C, Eutamene H, Théodorou V, Fioramonti J, Bueno L. Stress-induced visceral hypersensitivity to rectal distension in rats: role of CRF and mast cells. *Neurogastroenterol Motil*. 1997 Dec;9(4):271-9.

- Guerrini R, Calo G, Rizzi A, Bigoni R, Bianchi C, Salvadori S, Regoli D. A new selective antagonist of the nociceptin receptor. *Br J Pharmacol*. 1998 Jan;123(2):163-5.
- Guerrini R, Calo' G, Rizzi A, Bigoni R, Rizzi D, Regoli D, Salvadori S. Structure-activity relationships of nociceptin and related peptides: comparison with dynorphin A. *Peptides*. 2000 Jul;21(7):923-33.
- Guerrini R, Calo G, Rizzi A, Bianchi C, Lazarus LH, Salvadori S, Temussi PA, Regoli D. Address and message sequences for the nociceptin receptor: a structure-activity study of nociceptin-(1-13)-peptide amide. *J Med Chem*. 1997 Jun 6;40(12):1789-93.
- Halford WP, Gebhardt BM, Carr DJ. Functional role and sequence analysis of a lymphocyte orphan opioid receptor. *J Neuroimmunol*. 1995 Jun;59(1-2):91-101.
- Heinricher MM. Orphanin FQ/nociceptin: from neural circuitry to behavior. *Life Sci*. 2003 Jun 27;73(6):813-22.
- Herbert TB, Cohen S. Stress and immunity in humans: a meta-analytic review. *Psychosom Med*. 1993 Jul-Aug;55(4):364-79.
- Higa A, McKnight GW, Wallace JL. Attenuation of epithelial injury in acute experimental colitis by immunomodulators. *Eur J Pharmacol*. 1993 Aug 3;239(1-3):171-6.
- Houtani T, Nishi M, Takeshima H, Sato K, Sakuma S, Kakimoto S, Ueyama T, Noda T, Sugimoto T. Distribution of nociceptin/orphanin FQ precursor protein and receptor in brain and spinal cord: a study using in situ hybridization and X-gal histochemistry in receptor-deficient mice. *J Comp Neurol*. 2000 Aug 28;424(3):489-508.
- Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H, Lesage S, Cézard JP, Belaiche J, Almer S, Tysk C, O'Morain CA, Gassull M, Binder V, Finkel Y, Cortot A, Modigliani R, Laurent-Puig P, Gower-Rousseau C, Macry J, Colombel JF, Sahbatou M, Thomas G. Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature*. 2001 May 31;411(6837):599-603.
- Inoue M, Shimohira I, Yoshida A, Zimmer A, Takeshima H, Sakurada T, Ueda H. Dose-related opposite modulation by nociceptin/orphanin FQ of substance P nociception in the nociceptors and spinal cord. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999 Oct;291(1):308-13.
- Jenck F, Moreau JL, Martin JR, Kilpatrick GJ, Reinscheid RK, Monsma FJ Jr, Nothacker HP, Civelli O. Orphanin FQ acts as an anxiolytic to attenuate behavioral responses to stress. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Dec 23;94(26):14854-8.
- Jenck F, Ouagazzal AM, Pauly-Evers M, Moreau JL. OrphaninFQ: role in behavioral fear responses and vulnerability to stress? *Mol Psychiatry*. 2000 Nov;5(6):572-4.
- Joseph T, Lee TL, Li C, Siau C, Nishiuchi Y, Kimura T, Tachibana S. Levels of neuropeptides nocistatin, nociceptin/orphanin FQ and their precursor protein in a rat neuropathic pain model. *Peptides*. 2007 Jul;28(7):1433-40.

- Judd AK, Tuttle DJ, Jones RW, Sanchez A, Polgar W, Berzetei-Gurske I, Toll L. Structure-activity studies on high affinity NOP-active hexapeptides. *J Pept Res*. 2004 Sep;64(3):87-94.
- Julius D. Pharmacology. Home for an orphan endorphin. *Nature*. 1995 Oct 12;377(6549):476.
- Jurjus AR, Khoury NN, Reimund JM. Animal models of inflammatory bowel disease. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2004 Sep-Oct;50(2):81-92.
- Kaminsky DE, Rogers TJ. Suppression of CCL2/MCP-1 and CCL5/RANTES expression by nociceptin in human monocytes. *J Neuroimmune Pharmacol*. 2008 Jun;3(2):75-82.
- Kankuri E, Vaali K, Korpela R, Paakkari I, Vapaatalo H, Moilanen E. Effects of a COX-2 preferential agent nimesulide on TNBS-induced acute inflammation in the gut. *Inflammation*. 2001 Oct;25(5):301-10.
- Kapusta DR, Kenigs VA. Cardiovascular and renal responses produced by central orphanin FQ/nociceptin occur independent of renal nerves. *Am J Physiol*. 1999 Oct;277(4 Pt 2):R987-95.
- Kapusta DR, Sezen SF, Chang JK, Lippton H, Kenigs VA. Diuretic and antinatriuretic responses produced by the endogenous opioid-like peptide, nociceptin (orphanin FQ). *Life Sci*. 1997;60(1):PL15-21.
- Kato S, Tsuzuki Y, Hokari R, Okada Y, Miyazaki J, Matsuzaki K, Iwai A, Kawaguchi A, Nagao S, Itoh K, Suzuki H, Nabeshima T, Miura S. Role of nociceptin/orphanin FQ (Noc/oFQ) in murine experimental colitis. *J Neuroimmunol*. 2005 Apr;161(1-2):21-8.
- Kiank C, Taché Y, Larauche M. Stress-related modulation of inflammation in experimental models of bowel disease and post-infectious irritable bowel syndrome: role of corticotropin-releasing factor receptors. *Brain Behav Immun*. 2010 Jan;24(1):41-8.
- King M, Chang A, Pasternak GW. Functional blockade of opioid analgesia by orphanin FQ/nociceptin. *Biochem Pharmacol*. 1998 May 1;55(9):1537-40.
- Ko MH, Kim YH, Woo RS, Kim KW. Quantitative analysis of nociceptin in blood of patients with acute and chronic pain. *Neuroreport*. 2002 Sep 16;13(13):1631-3.
- Ko MC, Naughton NN, Traynor JR, Song MS, Woods JH, Rice KC, McKnight AT. Orphanin FQ inhibits capsaicin-induced thermal nociception in monkeys by activation of peripheral ORL1 receptors. *Br J Pharmacol*. 2002 Feb;135(4):943-50.
- Ko MC, Wei H, Woods JH, Kennedy RT. Effects of intrathecally administered nociceptin/orphanin FQ in monkeys: behavioral and mass spectrometric studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 2006 Sep;318(3):1257-64.
- Köster A, Montkowski A, Schulz S, Stübe EM, Knaudt K, Jenck F, Moreau JL, Nothacker HP, Civelli O, Reinscheid RK. Targeted disruption of the orphanin FQ/nociceptin gene increases stress susceptibility and impairs stress adaptation in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 31;96(18):10444-9.
- Krepuska M, Sótonyi P, Csobay-Novák C, Szeberin Z, Hartyánszky I, Zima E, Szilágyi N, Horkay F, Merkely B, Acsády G, Tekes K. Plasma

- nociceptin/orphanin FQ levels are lower in patients with chronic ischemic cardiovascular diseases—A pilot study. *Regul Pept.* 2011 Aug 8;169(1-3):1-5.
- Kotlinska J, Rafalski P, Biala G, Dylag T, Rolka K, Silberring J. Nociceptin inhibits acquisition of amphetamine-induced place preference and sensitization to stereotypy in rats. *Eur J Pharmacol.* 2003 Aug 8;474(2-3):233-9.
- Kummer W, Fischer A. Nociceptin and its receptor in guinea-pig sympathetic ganglia. *Neurosci Lett.* 1997 Sep 26;234(1):35-8.
- Kuo CJ, Liao YY, Guerrini R, Calo' G, Chiou LC. Quantitative study of [(pF)Phe⁴,Arg¹⁴,Lys¹⁵]nociceptin/orphanin FQ-NH₂ (UFP-102) at NOP receptors in rat periaqueductal gray slices. *Eur J Pharmacol.* 2008 Jan 28;579(1-3):110-5.
- Kuzmin A, Kreek MJ, Bakalkin G, Liljequist S. The nociceptin/orphanin FQ receptor agonist Ro 64-6198 reduces alcohol self-administration and prevents relapse-like alcohol drinking. *Neuropsychopharmacology.* 2007 Apr;32(4):902-10.
- Lachowicz JE, Shen Y, Monsma FJ Jr, Sibley DR. Molecular cloning of a novel G protein-coupled receptor related to the opiate receptor family. *J Neurochem.* 1995 Jan;64(1):34-40.
- Lakatos PL, Szamosi T, Lakatos L. Smoking in inflammatory bowel diseases: good, bad or ugly? *World J Gastroenterol.* 2007 Dec 14;13(46):6134-9.
- Lambert DG. The nociceptin/orphanin FQ receptor: a target with broad therapeutic potential. *Nat Rev Drug Discov.* 2008 Aug;7(8):694-710.
- Le Cudennec C, Naudin B, Do Rego JC, Costentin J. Nociceptin/orphanin FQ and related peptides reduce the increase in plasma corticosterone elicited in mice by an intracerebroventricular injection. *Life Sci.* 2002 Nov 29;72(2):163-71.
- Le Maître E, Vilpoux C, Costentin J, Leroux-Nicollet I. Opioid receptor-like 1 (NOP) receptors in the rat dorsal raphe nucleus: evidence for localization on serotonergic neurons and functional adaptation after 5,7-dihydroxytryptamine lesion. *J Neurosci Res.* 2005 Aug 15;81(4):488-96.
- Lécine P, Esmiol S, Métais JY, Nicoletti C, Nourry C, McDonald C, Nunez G, Hugot JP, Borg JP, Ollendorff V. The NOD2-RICK complex signals from the plasma membrane. *J Biol Chem.* 2007 May 18;282(20):15197-207.
- Lenz HJ, Raedler A, Greten H, Vale WW, Rivier JE. Stress-induced gastrointestinal secretory and motor responses in rats are mediated by endogenous corticotropin-releasing factor. *Gastroenterology.* 1988 Dec;95(6):1510-7.
- Letchworth SR, Mathis JP, Rossi GC, Bodnar RJ, Pasternak GW. Autoradiographic localization of (125)I[Tyr(14)]orphanin FQ/nociceptin and (125)I[Tyr(10)]orphanin FQ/nociceptin(1-11) binding sites in rat brain. *J Comp Neurol.* 2000 Jul 24;423(2):319-29.
- Li X, Keith DE Jr, Evans CJ. Multiple opioid receptor-like genes are identified in diverse vertebrate phyla. *FEBS Lett.* 1996 Nov 11;397(1):25-9.
- Lim WC, Hanauer SB. Emerging biologic therapies in inflammatory bowel disease. *Rev Gastroenterol Disord.* 2004 Spring;4(2):66-85.
- Ma F, Xie H, Dong ZQ, Wang YQ, Wu GC. Effects of electroacupuncture on orphanin FQ immunoreactivity and preproorphanin FQ mRNA in nucleus of

- raphe magnus in the neuropathic pain rats. *Brain Res Bull.* 2004 Jul 15;63(6):509-13.
- MacDermott RP. Alterations of the mucosal immune system in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol.* 1996 Dec;31(6):907-16.
- Makman MH, Dvorkin B. Presence of nociceptin (orphanin FQ) receptors in rat retina: comparison with receptors in striatum. *Eur J Pharmacol.* 1997 Nov 5;338(2):171-6.
- Malinowska B, Godlewski G, Schlicker E. Function of nociceptin and opioid OP4 receptors in the regulation of the cardiovascular system. *J Physiol Pharmacol.* 2002 Sep;53(3):301-24.
- Mamiya T, Yamada K, Miyamoto Y, König N, Watanabe Y, Noda Y, Nabeshima T. Neuronal mechanism of nociceptin-induced modulation of learning and memory: involvement of N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Psychiatry.* 2003 Aug;8(8):752-65.
- Marti M, Mela F, Veronesi C, Guerrini R, Salvadori S, Federici M, Mercuri NB, Rizzi A, Franchi G, Beani L, Bianchi C, Morari M. Blockade of nociceptin/orphanin FQ receptor signaling in rat substantia nigra pars reticulata stimulates nigrostriatal dopaminergic transmission and motor behavior. *J Neurosci.* 2004 Jul 28;24(30):6659-66.
- Marti M, Viaro R, Guerrini R, Franchi G, Morari M. Nociceptin/orphanin FQ modulates motor behavior and primary motor cortex output through receptors located in substantia nigra reticulata. *Neuropsychopharmacology.* 2009 Jan;34(2):341-55.
- Mathis JP, Rossi GC, Pellegrino MJ, Jimenez C, Pasternak GW, Allen RG. Carboxyl terminal peptides derived from prepro-orphanin FQ/nociceptin (ppOFQ/N) are produced in the hypothalamus and possess analgesic bioactivities. *Brain Res.* 2001 Mar 23;895(1-2):89-94.
- Matsushita H, Ishihara A, Mashiko S, Tanaka T, Kanno T, Iwaasa H, Ohta H, Kanatani A. Chronic intracerebroventricular infusion of nociceptin/orphanin FQ produces body weight gain by affecting both feeding and energy metabolism in mice. *Endocrinology.* 2009 Jun;150(6):2668-73.
- McCall RD, Haskill S, Zimmermann EM, Lund PK, Thompson RC, Sartor RB. Tissue interleukin 1 and interleukin-1 receptor antagonist expression in enterocolitis in resistant and susceptible rats. *Gastroenterology.* 1994 Apr;106(4):960-72.
- McCartney SA, Ballinger AB, Vojnovic I, Farthing MJ, Warner TD. Endothelin in human inflammatory bowel disease: comparison to rat trinitrobenzenesulphonic acid-induced colitis. *Life Sci.* 2002 Sep 6;71(16):1893-904.
- Meunier JC. Nociceptin/orphanin FQ and the opioid receptor-like ORL1 receptor. *Eur J Pharmacol.* 1997 Dec 4;340(1):1-15.
- Meunier JC, Mollereau C, Toll L, Suaudeau C, Moisand C, Alvinerie P, Butour JL, Guillemot JC, Ferrara P, Monsarrat B, et al. Isolation and structure of the endogenous agonist of opioid receptor-like ORL1 receptor. *Nature.* 1995 Oct 12;377(6549):532-5.

- Meunier J, Mouldous L, Topham CM. The nociceptin (ORL1) receptor: molecular cloning and functional architecture. *Peptides*. 2000 Jul;21(7):893-900.
- Miller TR, Fulford AJ. Regulation of nociceptin/orphaninFQ secretion by immune cells and functional modulation of interleukin-2. *Peptides*. 2007 Nov;28(11):2243-52.
- Mitsuma T, Rhue N, Kayama M, et al. Distribution of orphanin FQ in rat: an immunohistochemical study. *Med Sci Res* 1998; 26:403-5.
- Mogil JS, Pasternak GW. The molecular and behavioral pharmacology of the orphanin FQ/nociceptin peptide and receptor family. *Pharmacol Rev*. 2001 Sep;53(3):381-415.
- Mollereau C, Mouldous L. Tissue distribution of the opioid receptor-like (ORL1) receptor. *Peptides*. 2000 Jul;21(7):907-17.
- Mollereau C, Parmentier M, Mailleux P, Butour JL, Moisand C, Chalon P, Caput D, Vassart G, Meunier JC. ORL1, a novel member of the opioid receptor family. Cloning, functional expression and localization. *FEBS Lett*. 1994 Mar 14;341(1):33-8.
- Mollereau C, Simons MJ, Soularue P, Liners F, Vassart G, Meunier JC, Parmentier M. Structure, tissue distribution, and chromosomal localization of the prepronociceptin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Aug 6;93(16):8666-70.
- Montiel JL, Cornille F, Roques BP, Noble F. Nociceptin/orphanin FQ metabolism: role of aminopeptidase and endopeptidase 24.15. *J Neurochem*. 1997 Jan;68(1):354-61.
- Moran TD, Abdulla FA, Smith PA. Cellular neurophysiological actions of nociceptin/orphanin FQ. *Peptides*. 2000 Jul;21(7):969-76.
- Morris GP, Beck PL, Herridge MS, Depew WT, Szewczuk MR, Wallace JL. Hapten-induced model of chronic inflammation and ulceration in the rat colon. *Gastroenterology*. 1989 Mar;96(3):795-803.
- Morteau O, Hachet T, Caussette M, Bueno L. Experimental colitis alters visceromotor response to colorectal distension in awake rats. *Dig Dis Sci*. 1994 Jun;39(6):1239-48.
- Neal CR Jr, Owens CE, Taylor LP, Hoversten MT, Akil H, Watson SJ Jr. Binding and GTPgammaS autoradiographic analysis of preproorphanin precursor peptide products at the ORL1 and opioid receptors. *J Chem Neuroanat*. 2003
- Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Watson SJ Jr. Localization of orphanin FQ (nociceptin) peptide and messenger RNA in the central nervous system of the rat. *J Comp Neurol*. 1999a Apr 19;406(4):503-47.
- Neal CR Jr, Mansour A, Reinscheid R, Nothacker HP, Civelli O, Akil H, Watson SJ Jr. Opioid receptor-like (ORL1) receptor distribution in the rat central nervous system: comparison of ORL1 receptor mRNA expression with (125)I-[(14)Tyr]-orphanin FQ binding. *J Comp Neurol*. 1999b Oct 4;412(4):563-605.
- Neurath MF, Fuss I, Kelsall BL, Stüber E, Strober W. Antibodies to interleukin 12 abrogate established experimental colitis in mice. *J Exp Med*. 1995 Nov 1;182(5):1281-90. PubMed PMID: 7595199.

- Noble F, Roques BP. Association of aminopeptidase N and endopeptidase 24.15 inhibitors potentiate behavioral effects mediated by nociceptin/orphanin FQ in mice. *FEBS Lett.* 1997 Jan 20;401(2-3):227-9.
- Noda Y, Mamiya T, Manabe T, Nishi M, Takeshima H, Nabeshima T. Role of nociceptin systems in learning and memory. *Peptides.* 2000 Jul;21(7):1063-9.
- Nothacker HP, Reinscheid RK, Mansour A, Henningsen RA, Ardati A, Monsma FJ Jr, Watson SJ, Civelli O. Primary structure and tissue distribution of the orphanin FQ precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996 Aug 6;93(16):8677-82.
- Norton CS, Neal CR, Kumar S, Akil H, Watson SJ. Nociceptin/orphanin FQ and opioid receptor-like receptor mRNA expression in dopamine systems. *J Comp Neurol.* 2002 Mar 18;444(4):358-68.
- Obara I, Przewlocki R, Przewlocka B. Spinal and local peripheral antiallodynic activity of Ro64-6198 in neuropathic pain in the rat. *Pain.* 2005 Jul;116(1-2):17-25.
- Ogura Y, Bonen DK, Inohara N, Nicolae DL, Chen FF, Ramos R, Britton H, Moran T, Karaliuskas R, Duerr RH, Achkar JP, Brant SR, Bayless TM, Kirschner BS, Hanauer SB, Nuñez G, Cho JH. A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature.* 2001 May 31;411(6837):603-6.
- Okuda-Ashitaka E, Ito S. Nocistatin: a novel neuropeptide encoded by the gene for the nociceptin/orphanin FQ precursor. *Peptides.* 2000 Jul;21(7):1101-9.
- Okuda-Ashitaka E, Minami T, Tachibana S, Yoshihara Y, Nishiuchi Y, Kimura T, Ito S. Nocistatin, a peptide that blocks nociceptin action in pain transmission. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):286-9.
- Olszewski PK, Levine AS. Minireview: Characterization of influence of central nociceptin/orphanin FQ on consummatory behavior. *Endocrinology.* 2004 Jun;145(6):2627-32.
- Orholm M, Binder V, Sørensen TI, Rasmussen LP, Kyvik KO. Concordance of inflammatory bowel disease among Danish twins. Results of a nationwide study. *Scand J Gastroenterol.* 2000 Oct;35(10):1075-81.
- Osinski MA, Bass P, Gaumnitz EA. Peripheral and central actions of orphanin FQ (nociceptin) on murine colon. *Am J Physiol.* 1999a Jan;276(1 Pt 1):G125-31.
- Osinski MA, Brown DR. Orphanin FQ/nociceptin: a novel neuromodulator of gastrointestinal function? *Peptides.* 2000 Jul;21(7):999-1005.
- Pan YX, Xu J, Wan BL, Zuckerman A, Pasternak GW. Identification and differential regional expression of KOR-3/ORL-1 gene splice variants in mouse brain. *FEBS Lett.* 1998 Sep 11;435(1):65-8.
- Peluso J, LaForge KS, Matthes HW, Kreek MJ, Kieffer BL, Gavériaux-Ruff C. Distribution of nociceptin/orphanin FQ receptor transcript in human central nervous system and immune cells. *J Neuroimmunol.* 1998 Jan;81(1-2):184-92.
- Perše M, Cerar A. Dextran sodium sulphate colitis mouse model: traps and tricks. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:718617.
- Pettersson LM, Sundler F, Danielsen N. Expression of orphanin FQ/nociceptin and its receptor in rat peripheral ganglia and spinal cord. *Brain Res.* 2002 Aug 2;945(2):266-75.

- Podolsky DK. Inflammatory bowel disease. *N Engl J Med*. 2002 Aug 8;347(6):417-29.
- Pomonis JD, Billington CJ, Levine AS. Orphanin FQ, agonist of orphan opioid receptor ORL1, stimulates feeding in rats. *Neuroreport*. 1996 Dec 20;8(1):369-71.
- Redrobe JP, Calo G, Guerrini R, Regoli D, Quirion R. [Nphe(1)]-Nociceptin(1-13)-NH(2), a nociceptin receptor antagonist, reverses nociceptin-induced spatial memory impairments in the Morris water maze task in rats. *Br J Pharmacol*. 2000 Dec;131(7):1379-84.
- Redrobe JP, Calo' G, Regoli D, Quirion R. Nociceptin receptor antagonists display antidepressant-like properties in the mouse forced swimming test. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2002 Feb;365(2):164-7.
- Reinscheid RK, Ardati A, Monsma FJ Jr, Civelli O. Structure-activity relationship studies on the novel neuropeptide orphanin FQ. *J Biol Chem*. 1996 Jun 14;271(24):14163-8.
- Reinscheid RK, Higelin J, Henningsen RA, Monsma FJ Jr, Civelli O. Structures that delineate orphanin FQ and dynorphin A pharmacological selectivities. *J Biol Chem*. 1998 Jan 16;273(3):1490-5.
- Reinscheid RK, Nothacker HP, Bourson A, Ardati A, Henningsen RA, Bunzow JR, Grandy DK, Langen H, Monsma FJ Jr, Civelli O. Orphanin FQ: a neuropeptide that activates an opioidlike G protein-coupled receptor. *Science*. 1995 Nov 3;270(5237):792-4.
- Reinscheid RK, Nothacker H, Civelli O. The orphanin FQ/nociceptin gene: structure, tissue distribution of expression and functional implications obtained from knockout mice. *Peptides*. 2000 Jul;21(7):901-6.
- Reiss D, Wichmann J, Tekeshima H, Kieffer BL, Ouagazzal AM. Effects of nociceptin/orphanin FQ receptor (NOP) agonist, Ro64-6198, on reactivity to acute pain in mice: comparison to morphine. *Eur J Pharmacol*. 2008 Jan 28;579(1-3):141-8.
- Rizzi A, Bigoni R, Marzola G, Guerrini R, Salvadori S, Regoli D, Calo' G. Characterization of the locomotor activity-inhibiting effect of nociceptin/orphanin FQ in mice. *Naunyn Schmiedeberg Arch Pharmacol*. 2001 Feb;363(2):161-5.
- Rizzi A, Gavioli EC, Marzola G, Spagnolo B, Zucchini S, Ciccocioppo R, Trapella C, Regoli D, Calò G. Pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist SB-612111 [(-)-cis-1-methyl-7-[[4-(2,6-dichlorophenyl)piperidin-1-yl]methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ol]: in vivo studies. *J Pharmacol Exp Ther*. 2007 Jun;321(3):968-74.
- Rizzi A, Marzola G, Bigoni R, Guerrini R, Salvadori S, Mogil JS, Regoli D, Calò G. Endogenous nociceptin signaling and stress-induced analgesia. *Neuroreport*. 2001 Oct 8;12(14):3009-13.
- Rodi D, Zucchini S, Simonato M, Cifani C, Massi M, Polidori C. Functional antagonism between nociceptin/orphanin FQ (N/OFQ) and corticotropin-releasing factor (CRF) in the rat brain: evidence for involvement of the bed

- nucleus of the stria terminalis. *Psychopharmacology (Berl)*. 2008 Mar;196(4):523-31.
- Roques BP, Noble F, Daugé V, Fournié-Zaluski MC, Beaumont A. Neutral endopeptidase 24.11: structure, inhibition, and experimental and clinical pharmacology. *Pharmacol Rev*. 1993 Mar;45(1):87-146.
- Rossi GC, Leventhal L, Bolan E, Pasternak GW. Pharmacological characterization of orphanin FQ/nociceptin and its fragments. *J Pharmacol Exp Ther*. 1997 Aug;282(2):858-65.
- Rossi GC, Perlmutter M, Leventhal L, Talatti A, Pasternak GW. Orphanin FQ/nociceptin analgesia in the rat. *Brain Res*. 1998 May 11;792(2):327-30.
- Sakurada T, Sakurada S, Katsuyama S, Hayashi T, Sakurada C, Tan-No K, Johansson H, Sandin J, Terenius L. Evidence that N-terminal fragments of nociceptin modulate nociceptin-induced scratching, biting and licking in mice. *Neurosci Lett*. 2000 Jan 21;279(1):61-4.
- Sakurada C, Sakurada S, Katsuyama S, Sasaki J, Tan-No K, Sakurada T. Involvement of tachykinin NK1 receptors in nociceptin-induced hyperalgesia in mice. *Brain Res*. 1999 Sep 11;841(1-2):85-92.
- Sandin J, Georgieva J, Schött PA, Ogren SO, Terenius L. Nociceptin/orphanin FQ microinjected into hippocampus impairs spatial learning in rats. *Eur J Neurosci*. 1997 Jan;9(1):194-7.
- Sandin J, Georgieva J, Silberring J, Terenius L. In vivo metabolism of nociceptin/orphanin FQ in rat hippocampus. *Neuroreport*. 1999 Jan 18;10(1):71-6. PubMed PMID: 10094136. Schlicker E, Morari M. Nociceptin/orphanin FQ and neurotransmitter release in the central nervous system. *Peptides*. 2000 Jul;21(7):1023-9.
- Scoto GM, Aricò G, Iemolo A, Ronsisvalle S, Parenti C. Involvement of the Nociceptin/Orphanin FQ-NOP receptor system in the ventrolateral periaqueductal gray following mechanical allodynia in chronic pain. *Life Sci*. 2009 Jul 31;85(5-6):206-10.
- Scoto GM, Aricò G, Ronsisvalle S, Parenti C. Blockade of the nociceptin/orphanin FQ/NOP receptor system in the rat ventrolateral periaqueductal gray potentiates DAMGO analgesia. *Peptides*. 2007 Jul;28(7):1441-6.
- Selby WS. Current issues in Crohn's disease. *Med J Aust*. 2003 Jun 2;178(11):532-3.
- Serhan CN, Fierro IM, Chiang N, Pouliot M. Cutting edge: nociceptin stimulates neutrophil chemotaxis and recruitment: inhibition by aspirin-triggered-15-epi-lipoxin A4. *J Immunol*. 2001 Mar 15;166(6):3650-4.
- Shimohigashi Y, Hatano R, Fujita T, Nakashima R, Nose T, Sujaku T, Saigo A, Shinjo K, Nagahisa A. Sensitivity of opioid receptor-like receptor ORL1 for chemical modification on nociceptin, a naturally occurring nociceptive peptide. *J Biol Chem*. 1996 Sep 27;271(39):23642-5.
- Siniscalchi A, Rodi D, Beani L, Bianchi C. Inhibitory effect of nociceptin on [3H]-5-HT release from rat cerebral cortex slices. *Br J Pharmacol*. 1999 Sep;128(1):119-23.

- Sirianni MJ, Fujimoto KI, Nelson CS, Pellegrino MJ, Allen RG. Cyclic AMP analogs induce synthesis, processing, and secretion of prepro nociceptin/orphanin FQ-derived peptides by NS20Y neuroblastoma cells. *DNA Cell Biol.* 1999 Jan;18(1):51-8.
- Slowe SJ, Clarke S, Lena I, Goody RJ, Lattanzi R, Negri L, Simonin F, Matthes HW, Filliol D, Kieffer BL, Kitchen I. Autoradiographic mapping of the opioid receptor-like 1 (ORL1) receptor in the brains of mu-, delta- or kappa-opioid receptor knockout mice. *Neuroscience.* 2001;106(3):469-80.
- Spagnolo B, Carrà G, Fantin M, Fischetti C, Hebbes C, McDonald J, Barnes TA, Rizzi A, Trapella C, Fanton G, Morari M, Lambert DG, Regoli D, Calò G. Pharmacological characterization of the nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist SB-612111 [(-)-cis-1-methyl-7-[[4-(2,6-dichlorophenyl)piperidin-1-yl]methyl]-6,7,8,9-tetrahydro-5H-benzocyclohepten-5-ol]: in vitro studies. *J Pharmacol Exp Ther.* 2007 Jun;321(3):961-7.
- Stein J, Ries J, Barrett KE. Disruption of intestinal barrier function associated with experimental colitis: possible role of mast cells. *Am J Physiol.* 1998 Jan;274(1 Pt 1):G203-9.
- Suder P, Kotlinska J, Smoluch MT, Sällberg M, Silberring J. Metabolic fate of nociceptin/orphanin FQ in the rat spinal cord and biological activity of its released fragment. *Peptides.* 1999;20(2):239-47.
- Taché Y, Perdue MH. Role of peripheral CRF signalling pathways in stress-related alterations of gut motility and mucosal function. *Neurogastroenterol Motil.* 2004 Apr;16 Suppl 1:137-42.
- Takahashi T, Mizuta Y, Owyang C. Orphanin FQ, but not dynorphin A, accelerates colonic transit in rats. *Gastroenterology.* 2000 Jul;119(1):71-9.
- Taniguchi H, Yomota E, Nogi K, Onoda Y, Ikezawa K. The effect of nociceptin, an endogenous ligand for the ORL1 receptor, on rat colonic contraction and transit. *Eur J Pharmacol.*
- te Velde AA, Verstege MI, Hommes DW. Critical appraisal of the current practice in murine TNBS-induced colitis. *Inflamm Bowel Dis.* 2006 Oct;12(10):995-9.
- Terenius L, Sandin J, Sakurada T. Nociceptin/orphanin FQ metabolism and bioactive metabolites. *Peptides.* 2000 Jul;21(7):919-22.
- Toll L, Khroyan TV, Polgar WE, Jiang F, Olsen C, Zaveri NT. Comparison of the antinociceptive and antirewarding profiles of novel bifunctional nociceptin receptor/mu-opioid receptor ligands: implications for therapeutic applications. *J Pharmacol Exp Ther.* 2009 Dec;331(3):954-64.
- Topham CM, Moulédous L, Poda G, Maigret B, Meunier JC. Molecular modelling of the ORL1 receptor and its complex with nociceptin. *Protein Eng.* 1998 Dec;11(12):1163-79. Erratum in: *Protein Eng* 1999 Oct;12(10):893.
- Trapella C, Guerrini R, Piccagli L, Calò G, Carra' G, Spagnolo B, Rubini S, Fanton G, Hebbes C, McDonald J, Lambert DG, Regoli D, Salvadori S. Identification of an achiral analogue of J-113397 as potent nociceptin/orphanin FQ receptor antagonist. *Bioorg Med Chem.* 2006 Feb 1;14(3):692-704.

- Varani K, Rizzi A, Calo G, Bigoni R, Toth G, Guerrini R, Gessi S, Salvadori S, Borea PA, Regoli D. Pharmacology of [Tyr1]nociceptin analogs: receptor binding and bioassay studies. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1999 Sep;360(3):270-7.
- Vaughan CW, Christie MJ. Increase by the ORL1 receptor (opioid receptor-like1) ligand, nociceptin, of inwardly rectifying K conductance in dorsal raphe nucleus neurones. *Br J Pharmacol*. 1996 Apr;117(8):1609-11.
- Waits PS, Purcell WM, Fulford AJ, McLeod JD. Nociceptin/orphanin FQ modulates human T cell function in vitro. *J Neuroimmunol*. 2004 Apr;149(1-2):110-20.
- Wallace JL, Keenan CM, Gale D, Shoupe TS. Exacerbation of experimental colitis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs is not related to elevated leukotriene B4 synthesis. *Gastroenterology*. 1992 Jan;102(1):18-27.
- Wallace JL, McKnight W, Asfaha S, Liu DY. Reduction of acute and reactivated colitis in rats by an inhibitor of neutrophil activation. *Am J Physiol*. 1998 May;274(5 Pt 1):G802-8.
- Wang JB, Johnson PS, Imai Y, Persico AM, Ozenberger BA, Eppler CM, Uhl GR. cDNA cloning of an orphan opiate receptor gene family member and its splice variant. *FEBS Lett*. 1994 Jul 4;348(1):75-9.
- Wei Y, Ouyang D, Liu Y, Chang Z, Tang J, Ding J. Peripheral tissue distribution of orphanin FQ precursor mRNA in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Chin Med Sci J*. 1999 Jun;14(2):67-70.
- Wick MJ, Minnerath SR, Lin X, Elde R, Law PY, Loh HH. Isolation of a novel cDNA encoding a putative membrane receptor with high homology to the cloned mu, delta, and kappa opioid receptors. *Brain Res Mol Brain Res*. 1994 Nov;27(1):37-44.
- Williams JP, Thompson JP, McDonald J, Barnes TA, Cote T, Rowbotham DJ, Lambert DG. Human peripheral blood mononuclear cells express nociceptin/orphanin FQ, but not mu, delta, or kappa opioid receptors. *Anesth Analg*. 2007 Oct;105(4):998-1005, table of contents.
- Witta J, Palkovits M, Rosenberger J, Cox BM. Distribution of nociceptin/orphanin FQ in adult human brain. *Brain Res*. 2004 Jan 30;997(1):24-9.
- Xie G, Ito E, Maruyama K, Pietruck C, Sharma M, Yu L, Pierce Palmer P. An alternatively spliced transcript of the rat nociceptin receptor ORL1 gene encodes a truncated receptor. *Brain Res Mol Brain Res*. 2000 Apr 14;77(1):1-9.
- Yazdani A, Takahashi T, Bagnol D, Watson SJ, Owyang C. Functional significance of a newly discovered neuropeptide, orphanin FQ, in rat gastrointestinal motility. *Gastroenterology*. 1999 Jan;116(1):108-17.
- Yu J, Chait BT, Toll L, Kreek MJ. Nociceptin in vitro biotransformation in human blood. *Peptides*. 1996;17(5):873-6.
- Yuan L, Han Z, Chang JK, Han JS. Accelerated release and production of orphanin FQ in brain of chronic morphine tolerant rats. *Brain Res*. 1999 May 1;826(2):330-4.

- Yüce B, Sibaev A, Haaken A, Saur D, Allescher HD, Göke B, Timmermans JP, Storr M. ORL-1 receptor mediates the action of nociceptin on ascending myenteric reflex pathways in rats. *Gastroenterology*. 2007 Aug;133(2):574-86.
- Zhao H, Wu GC, Cao XD. Immunomodulatory activity of orphanin FQ/nociceptin on traumatic rats. *Acta Pharmacol Sin*. 2002 Apr;23(4):343-8.
- Zeilhofer HU, Calò G. Nociceptin/orphanin FQ and its receptor—potential targets for pain therapy? *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Aug;306(2):423-9.
- Zádori ZS, Shujaa N, Köles L, Király KP, Tekes K, Gyires K. Nocistatin and nociceptin given centrally induce opioid-mediated gastric mucosal protection. *Peptides*. 2008 Dec;29(12):2257-65.